

Aus der Klinik für Innere Medizin,
Schwerpunkt Gastroenterologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mathias Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Regulation der PAR2 Genexpression durch entzündliche Stimuli im Intestinum



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Michael Himpel
aus Ueckermünde

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 10.12.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. S. Böhm

Korreferent: PD Dr. L. Hellmeyer

Meiner Frau Anita und meinem Sohn Max, meinen Eltern sowie meinem besten Freund Lars
in Liebe, Dankbarkeit und Freundschaft gewidmet.

1.	Einleitung	3
1.1.	Die PAR Familie	3
1.2.	PAR2 aktivierende Proteine	4
1.3.	Singnaltransduktion	5
1.4.	Desensitisierung	6
1.5.	Expressionsmuster der Protease-aktivierten Rezeptoren	8
2.	Materialien und Methoden	11
2.1.	Materialien	11
2.1.1.	Zellkultur	11
2.1.2.	DSS–Kolitis–Maus–Modell	15
2.1.3.	M. Crohn und Colitis ulcerosa Patienten Proben	16
2.1.4.	Stimulationsexperimente	16
2.1.4.1.	Stimulation von HT29 und Caco2 mit Zytokinen	16
2.1.4.2.	Stimulation von HT29 und Caco2 mit Bakterien	17
2.1.5.	RNA-Isolierung	17
2.1.6.	cDNA Synthese	18
2.1.7.	Quantitative Real-Time-PCR	19
2.1.8.	Konventionelle PCR	20
2.1.9.	Gelelektrophorese	20
2.2.	Methoden	21
2.2.1.	Zellkultur	21
2.2.2.	DSS–Kolitis–Maus–Modell	21
2.2.3.	M. Crohn und Colitis ulcerosa Patienten Proben	24
2.2.4.	Stimulationsexperimente	24
2.2.4.1.	Stimulation von HT29 und Caco2 mit Zytokinen	24
2.2.4.2.	Stimulation von HT29 und Caco2 mit Bakterien	25
2.2.5.	RNA-Isolierung	27
2.2.6.	cDNA Synthese	29
2.2.7.	Quantitative Real-Time-PCR	30
2.2.8.	Konventionelle PCR	31
2.2.9.	Gelelektrophorese	32
2.2.10.	Statistische Testverfahren	33

3.	Ergebnisse	34
3.1.	Stimulation HT29 und Caco2 mit Zytokinen und LPS	34
3.1.1.	Stimulation HT29 mit Zytokinen und LPS	34
3.1.2.	Stimulation Caco2 mit Zytokinen und LPS	41
3.1.3.	Zusammenfassung: HT29 und Caco2 mit Zytokinen	46
3.2.	Stimulation HT29 und Caco2 mit Bakterien	49
3.2.1.	Stimulation HT29 und Caco2 mit Bakterien 1	49
3.2.1.1.	Stimulation HT29 mit Bakterien Versuchsaufbau 1	50
3.2.1.2.	Stimulation Caco2 mit Bakterien Versuchsaufbau 1	55
3.2.1.3.	Zusammenfassung HT29 und Caco2 mit Bakterien 1	60
3.2.2.	Stimulation HT29 und Caco2 mit Bakterien 2	63
3.2.2.1.	Stimulation HT29 mit Bakterien Versuchsaufbau 2	64
3.2.2.2.	Stimulation Caco2 mit Bakterien Versuchsaufbau 2	82
3.2.2.3.	Zusammenfassung HT29 und Caco2 mit Bakterien 2	100
3.3.	DSS–Kolitis–Maus–Modell	107
3.4.	Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa	111
3.4.1.	Gewebeproben von M. Crohn Patienten	112
3.4.2.	Gewebeproben von Colitis ulcerosa Patienten	116
3.4.3.	Zusammenfassung Darmbiopsien	120
4.	Diskussion	122
4.1.	HT29 und Caco2 mit Zytokinen	126
4.2.	HT29 und Caco2 mit Bakterien	128
4.2.1.	HT29 und Caco2 mit Bakterien – Versuchsaufbau 1	128
4.2.2.	HT29 und Caco2 mit Bakterien – Versuchsaufbau 2	131
4.3.	DSS–Kolitis–Maus–Modell	137
4.4.	Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa	139
5.	Literaturverzeichnis	146
6.	Herstellerverzeichnis	157
7.	Zusammenfassung	159
8.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	161
9.	Danksagung	162

1. Einleitung

1.1. Die PAR-Familie

Die Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR's) gehören zu einer in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts neu entdeckten Klasse von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die, wie der Name andeutet, durch eine proteolytische Spaltung aktiviert werden (23). Bisher wurden vier Rezeptoren, PAR1 bis PAR4, entdeckt.

Der erste Rezeptor dieser Gruppe, PAR1, der Thrombin-Rezeptor, wurde bei Untersuchungen, die die Aktivierung von Thrombozyten näher beleuchten sollte, identifiziert.

Zwei Arbeitsgruppen klonierten den Rezeptor, der aus 425 Aminosäuren besteht und die für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor typischen 7 hydrophoben Domänen enthielt. Die Schnittstelle für Thrombin liegt zwischen Arginin⁴¹ und Serin⁴² (72, 75, 96).

Der zweite Protease-aktivierte Rezeptor, PAR2, wurde bei der Durchsuchung einer Gen-Bibliothek der Maus mittels eines Primers für die 6. bzw. 7. transmembranäre Domäne des bovinen Neurokinin-2 Rezeptors entdeckt. Der Klon kodierte für ein Protein, welches aus 395 Aminosäuren aufgebaut ist und wies zudem deutliche Eigenschaften eines Protease aktivierten Rezeptors auf. Der PAR2 zeigte außerdem eine 30-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit der Sequenz des PAR1 Rezeptors. Das N-terminale Ende besteht aus 46 Aminosäuren, wobei zwischen Arginin³⁴ und Serin³⁵ die Schnittstelle für Trypsin zu finden ist (66, 67, 72).

Einer Arbeitsgruppe aus San Francisco gelang es aus humaner cDNA den Protease-aktivierten Rezeptor 2 zu isolieren. PAR2 des Menschen besteht aus 1191 Basenpaaren, die für ein aus 397 Aminosäuren aufgebautes Protein kodieren. Der humane PAR2 ist zu 83 Prozent mit dem Maus-PAR2 (mPAR) identisch (9).

Die Erkenntnis, dass Thrombozyten von Mäusen, die kein mPAR1 exprimieren können, trotzdem auf Thrombin reagierten, während Fibroblasten, welche nachweislich ausschließlich PAR1 exprimieren, keinen Effekt aufzeigten (19, 72), legte die Theorie nahe, dass weitere Protease-aktivierte Rezeptoren existieren müssen.

Die Suche nach Homologen zwischen PAR1 und PAR2 Sequenzen in der RNA von Ratten – Thrombozyten führte zur Entdeckung von PAR3. Der humane Rezeptor PAR3 hat eine 28prozentige Ähnlichkeit mit dem humanen PAR1 bzw. PAR2 (44).

Wie PAR1 und PAR2 ist auch PAR3 ein charakteristischer G-Protein gekoppelter Rezeptor mit einer Thrombin-Schnittstelle im extrazellulären N-terminalen Ende zwischen Lysin³⁸ und Threonin³⁹ (72).

PAR-ähnliche Sequenzen wurden beim Screening von Sequenz-Datenbanken entdeckt (47, 72). Diese wurden für die Klonierung von PAR4 verwendet (101).

Die Proteasen-Schnittstelle befindet sich bei PAR4 zwischen Arginin⁴⁷ und Glycin⁴⁸. PAR4 ist zu 33 Prozent mit den anderen Protease – aktivierten Rezeptoren identisch (72).

1.2. PAR2 aktivierende Proteine

Die Rezeptoren PAR1, PAR3 und PAR4 werden von Thrombin, PAR2 und PAR4 von Trypsin und anderen Proteasen aktiviert (44, 47). PAR2 kann durch verschiedene Proteasen wie Trypsin (52), der Mastzell-Tryptase (20, 63), der neutrophilen Protease 3 (91), einem Komplex aus Gewebefaktor, Faktor VIIa (Konvertin) und Faktor Xa (aktivierter Stuart–Prower–Faktor) (11) und der membranständigen Serine-Protease-1 (MTSP-1) (86), nicht aber durch Thrombin aktiviert werden (22).

Des Weiteren ist bekannt, dass Staubmilben, *Dermatophagoides pteronyssinus* und *Dermatophagoides farinae*, über Proteasen wie Trypsin und Chymotrypsin verfügen. Die proteolytischen Allergene DerP3 und DerP9 führten in Epithelzellen des humanen Atemtraktes zu einer Ausschüttung von Cytokinen und einem intrazellulären Ca^{2+} - Anstieg mittels Aktivierung von PAR2 (51). Es konnte nachfolgend nachgewiesen werden, dass diese Allergene in der Lage sind Teile von PAR2 zu spalten, was wiederum zu den beschriebenen Effekten bei den Epithelzellen des Bronchialsystems führt (88).

Auch Bakterien sind in der Lage mittels ihrer Proteasen PAR2 zu aktivieren. Dies ist zum Beispiel für *Porphyromonas gingivalis*, der eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parodontitis spielt, belegt (60). Für experimentelle Zwecke wurde ein Peptid entwickelt, welches aus der Aminosäurefolge Serin-Leucin-Isoleucin-Glycin-Lysin-Valin besteht und in der Lage ist PAR2 selektiv zu aktivieren.

1.3. Signaltransduktion

Trypsin bindet an den N-terminalen Teil des PAR2 und spaltet diesen zwischen Arginin³⁴ und Serin³⁵. Durch diese Spaltung entsteht ein neuer, veränderter N-Terminus. Dieser dient nachfolgend als Ligand, welcher eine intramolekulare Bindung im Rezeptor eingeht. Beim humanen PAR2 besteht dieser neue Ligand aus den Aminosäuren Serin, Leucin, Isoleucin, Glycin, Lysin und Valin (9).

Die Tatsache, dass Trypsin PAR2 spaltet, zeigten Versuche mit Antikörpern gegen den N-terminalen Anteil des Rezeptors an der Oberfläche von Epithelzellen. Bei diesen Versuchen wurden zunächst PAR2 exprimierende Epithelzellen mit Trypsin versetzt. Nachfolgend konnte immunhistochemisch durch das Ausbleiben der Immunantwort gegen das Oberflächenantigen des Rezeptors die Spaltung von PAR2 aufgezeigt werden (8).

Für die intramolekulare Bindung des Liganden und damit für die Aktivierung des Rezeptors ist die zweite extrazelluläre Schleife von besonderer Bedeutung (58), da Mutationen in diesem Teil des Rezeptors zu einer deutlichen Reduktion der Signalstärke bzw. Zellantwort nach Stimulation mit Trypsin führten (2).

Nachdem die Bindung des Liganden an der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors zu Stande gekommen ist, wird die intrazelluläre Phospholipase C- β_1 aktiviert, was in der Bildung von Inositol-Triphosphat mündet. Dies bewirkte z.B. in Enterocyten, PAR2-transfizierten Zellen und Tumorzellen einen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} , eine Zunahme von Diacylglycerol und die Aktivierung der Protein-Kinase-C (9, 52, 65, 66).

PAR2 vermittelte Effekte werden wahrscheinlich über die G_α Untereinheit des Rezeptors $G_{q\alpha}$ übertragen, da die Signalantwort von PAR2 nicht durch Pertussis-Toxin, welches das G-Protein G_i hemmt, beeinflusst wird (27). Außerdem spricht die Kopplung von PAR2 an Phospholipase C- β_1 und das Expressionsmuster des Rezeptors für die $G_{q\alpha}$ und gegen die G_i Subfamilie oder andere Mitglieder der G_q Subfamilie. Des Weiteren kommt es in Enterocyten und PAR2-transfizierten Zellen durch die Aktivierung von PAR2 zur Freisetzung von Arachidonsäure und zur verstärkten Bildung von Prostaglandin E_2 und $F_{1\alpha}$. Wahrscheinlich führt die Aktivierung von PAR2 zur Aktivierung von Phospholipase A2 und Cyclooxygenase-1 (52, 72).

Substanzen, die die PAR2-Signalkaskade in Gang bringen, aktivieren zudem Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAP - Kinasen) (7, 27).

1.4. Desensitisierung

Da Proteasen wie Trypsin PAR2 spalten und damit irreversibel aktivieren, könnte dies prinzipiell zu einer ständigen Signalübertragung führen. Der generelle Mechanismus, durch den die Signalübertragung von PAR's beendet wird, ist gut an Untersuchungen des Rhodopsins und des β_2 -adrenergen Rezeptors beschrieben (7, 72). Jedoch bestehen gewisse Unterschiede zwischen konventionellen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und den Protease aktivierten Rezeptoren.

Repetitive Stimulation von Enterozyten und PAR2-transfizierten Zellen mit Trypsin und PAR2-aktivierendem Peptid zeigen einen verminderten Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} (8).

Dieser nachlassende Effekt von PAR2-aktivierendem Peptid und Trypsin, gemessen am intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, lässt auf ein ausgeprägtes Regulationssystem schließen.

Die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelten Effekte nehmen nach längerer Zeit der Aktivierung ab. Eine Schlüsselrolle für diesen Aktivitätsverlust spielen dabei Proteinkinasen, die zu einer Phosphorylierung der intrazellulären Domänen des Rezeptors (C-terminale Serin- oder Threonin-Reste) führen. Generell müssen dabei zwei Typen von Kinasen unterschieden werden. Dies sind zum einen die G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen und zum anderen Kinasen, welche durch Second-Messenger aktiviert werden. Die Phosphorylierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren kann, je nach Rezeptor, zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, ausgelöst durch bestimmte elektrochemische Wechselwirkungen führen oder eine Bindung des Rezeptors mit β -Arrestinen herbeiführen. Diese Reaktion mit β -Arrestinen verhindert bei manchen Rezeptoren einerseits die Wiederankopplung der G-Proteinuntereinheit bzw. führt durch die Bindung an β -Arrestin zur Internalisierung des Rezeptors.

Bei PAR2 ist der Mechanismus der Desensitisierung wahrscheinlich Protein-Kinase C vermittelt, wobei dieser durch Phosphorylierung verändert wird. Beim humanen PAR2 besteht der neue Ligand aus den Aminosäuren Serin, Leucin, Isoleucin, Glycin, Lysin und Valin (9). Die Protein-Kinase-C mit ihrer Spezifität zur Phosphorylierung von

Serin- und Threoninresten scheint deshalb eine besondere Rolle zu spielen (8, 27). Ein Hinweis für die Inaktivierung des Rezeptors durch die Protein-Kinase-C liefert die Aktivierung der Kinase durch Phorbol-Ester. Die Aktivierung von PAR2 in Enterocyten und transfizierten Zellen zeigt keinen messbaren Effekt der PAR-Aktivierung, während eine Hemmung der Protein-Kinase-C eine Verstärkung der PAR2-Wirkung hervorruft (72).

Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung der Protein-Kinase-C, wird durch Versuche, mit einer Mutation des PAR2 im carboxyterminalen Teil belegt, einem Teil, der für den Angriff der Protein-Kinase-C und damit für die Signalterminierung von Bedeutung ist. Bei dieser Mutation führt eine Aktivierung der Protein-Kinase-C durch Phorbol-Ester nicht zu einer Signalterminierung. Die Mutation bewirkt im Gegenteil einen überhöhten Ca^{2+} Anstieg und eine geringere Desensibilisierung bei wiederholten Stimulationen mit Trypsin und PAR2-aktivierendem Peptid (8, 27).

Durch die permanente Bindung des Liganden am Rezeptor erfolgt die Rekrutierung intrazellulär gelegener G-Protein-Rezeptor-Kinasen zum PAR2. Bei den G-Protein-Rezeptor-Kinasen handelt es sich um Serin-Threonin-Kinasen, die den aktivierten Rezeptor im carboxyterminalen Bereich bzw. in der dritten intrazellulären Schleife phosphorylieren (72).

Daraus resultiert nun eine Trennung des Rezeptors vom G-Protein, was die Signalübertragung des Rezeptors im Zytosol beendet.

Die Phosphorylierung wiederum bewirkt eine Translokation von β_1 -Arrestin vom Zytosol zur Plasmamembran. β_1 -Arrestin, ein mit dem Rezeptor interagierendes Membranprotein, koppelt den Rezeptor an Clathrin und AP2, ein weiteres Adapterprotein. Nachdem der Rezeptor vom G-Protein entkoppelt wurde, wird er über β_1 -Arrestin und Clathrin-Coated-Pits endozytiert und PAR2 und β_1 -Arrestin erscheinen kurze Zeit später gleichzeitig in frühen Endosomen (8, 28).

β_1 -Arrestin taucht später wieder im Zytosol auf, während PAR2 in Lysosomen abgebaut wird. Viele dieser Schritte werden durch rab-GTPasen, im speziellen durch Rab5a, vermittelt (78). Zwei Beobachtungen verdeutlichen, dass β_1 -Arrestin für die Endozytose von PAR2 von besonderer Bedeutung ist.

Eine Mutation im Bereich der Clathrin-Bindungsstelle von β_1 -Arrestin, genau β_1 -Arrestin⁴¹⁸⁻⁴¹⁹, verhindert eine Endozytose. Zudem zeigt ein PAR2-Mutuant, welcher

unfähig ist mit β_1 -Arrestin zu interagieren, eine fehlende Internalisation des Rezeptors und eine beeinträchtigte Desensibilisierung (72).

Des Weiteren ist am Vorgang der Endozytose auch Dynamin beteiligt. Dies belegen Untersuchungen, bei denen es unter GTPase-defektem Dynamin nicht zur Endozytose kam (78).

Bei herkömmlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit löslichem Liganden ist der Rezeptor nach der Aktivierung und Bindung des G-Proteins an den Rezeptor wieder aktivierbar.

Wie schon beschrieben, ist die Spaltung von PAR's und damit deren Aktivierung ein einmaliger Vorgang, da die Rezeptoren nicht regeneriert werden können. Um die Zelle weiterhin für neue Signale empfangsbereit zu halten, müssen neue Rezeptoren synthetisiert und/ oder vorhandene in die Membran eingebaut werden. In vielen Zellen sind für PAR2 vorgefertigte Speicher nachweisbar (8). Für den Transport von PAR2 aus dem Golgi-Apparat sind wiederum GTPasen von Bedeutung. Im Falle des Transportes zur Zellmembran ist dies Rab11a (78). Rab11a defekte Zellen, welche stattdessen Rab11aS25N exprimieren, zeigen eine deutliche Ansammlung von PAR2 Speichervesikeln im Golgi-Apparat. Die Überexpression von Rab11a führt zu einer schnelleren Erholung der Rezeptorantwort nach repetitiven Stimulationen mit Trypsin.

1.5. Expressionsmuster der Protease-aktivierten Rezeptoren

Die Protease-aktivierten Rezeptoren sind eine im menschlichen Körper weit verbreitete Gruppe von Rezeptoren.

PAR1 befindet sich z. B. in humanen Thrombozyten (46), Epithelzellen der humanen V. umbilicalis (62, 69), den glatten Muskelzellen der humanen Blutgefäße (24), im Gehirn von Ratten (64), in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, den Zellen von glatter Muskulatur, den Nervenzellen des Gastrointestinaltraktes (9, 21), den Atemwegen der Ratte (15) und in der Haut (85).

PAR2 wird von humanen Granulozyten (neutrophil) (41), von Epithelzellen der humanen V. umbilicalis (62, 69), Muskelzellen der Gefäßwand (24), dem menschlichen Gehirn (24), dem ersten affärenten Neuron des Rückenmarks (86) und der Niere (9) exprimiert.

Besonders stark kann PAR2 im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Hier vor allem in den Epithelzellen des Dün- und Dickdarms, dem Magen, dem Pankreas und der Leber (9).

In den Atemwegen ist PAR2 in den Epithelzellen, den glatten Muskelzellen der Luftwege, einigen Drüsen und im Endothel der Gefäße anzutreffen (15, 18, 24).

In der Haut zeigt sich PAR2 im Stratum spinosum, Stratum corneum, den Haarfollikeln nicht jedoch in Melanozyten (86).

PAR3 ist, wie auch PAR1 und PAR2, in der humanen V. umbilicalis (62) und im Dünndarm (44) exprimiert.

PAR4 konnte in humanen Thrombozyten (46), im Pankreas, im Dün- und im Dickdarm (47, 101) nachgewiesen werden.

Dabei übernehmen die Rezeptoren in Physiologie wie auch Pathophysiologie wichtige Aufgaben. In bisherigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von PAR2 zur Relaxation von Blutgefäßen (34), Hypotension (17, 77), vermehrter Adhäsion und Migration von Leukozyten (93) und Granulozyten (95), verstärkter Gefäßdurchlässigkeit mit Ödem (86) und zu neurogenen Schmerzen (94) führte. Außerdem zeigte sich nach der Aktivierung von PAR2 ein Anstieg von Prostglandinen und Zytokinen (91).

Die Funktion von PAR2 in Physiologie und Pathophysiologie des Gastrointestinaltraktes ist jedoch immer noch unzureichend verstanden.

Mit dem Nachweis, dass intestinale Epithelzellen auf entzündliche Stimuli mit einem Anstieg der IL-8 Expression reagieren, war es möglich, die Reaktion der intestinalen Epithelzellen nach Aktivierung des PAR2 zu untersuchen.

Eine Studie befasste sich mit dem Nachweis von PAR2 und mit der Produktion von Interleukin 8 und Interleukin 1 in dermalen Kapillarendothelzellen (81). Diese Ergebnisse legten für PAR2 nahe, dass der Rezeptor bei der Initiation und Modulation bei entzündlichen Reaktionen beteiligt sein könnte.

In einer weiteren Studie führte die Aktivierung von PAR2 in nativen Mäusen zu proinflammatorischen Effekten (12).

Andere Studien zeigten für PAR2 eine proinflammatorische Wirkung und wiesen dies in einem PAR2 Knock-Out-Maus-Modell bei Tieren mit einem Mangel an PAR2 nach (59).

In weiteren Studien mit PAR2 Knock-Out-Mäusen konnte im Zusammenhang mit der Aktivierung von PAR2 ebenfalls eine proinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden (31, 79).

Die Ergebnisse der genannten Studien können als weitere Hinweise für die proinflammatorische Wirkung von PAR2 angesehen werden.

Zwei Studien zeigten für PAR2 eine antiinflammatorische Wirkung auf (32, 49).

Alle diese Studien, bis auf die Arbeiten von Fiorucci et al. (32) und Kawabata et al. (49), welche für PAR2 eine antiinflammatorische Wirkung proklamieren, zeigten, dass sich durch eine Aktivierung von PAR2, sei es durch Proteasen wie Trypsin und β -Tryptase oder PAR2 aktivierendem Peptid, proinflammatorische Prozesse auslösen lassen.

Dennoch wurde in den meisten Studien über die Aktivierung von PAR2 eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Dies stellt jedoch höchstwahrscheinlich nur einen Teil der gesamten in der Zelle ablaufenden Reaktion dar, wobei in diesem Zusammenhang keine genaueren Untersuchungen über das Ausmaß der Expression von PAR2 oder anderer Gene unternommen wurden.

Wie bereits erwähnt, ist PAR2 ubiquitär jedoch besonders auffällig im Gastrointestinaltrakt exprimiert. Aus diesem Grund haben wir die Expression von PAR2 in einem für Entzündungsvorgänge mehrfach erprobten Zellkulturmodell mit Zytokinen bei den intestinalen Kolonkarzinom-Epithelzelllinien HT29 und Caco2 in verschiedenen Entzündungsmodellen und ihre Wirkungen auf die PAR2 Expression und anderer Gene näher untersucht. Unsere Studien sollten die Reaktion von PAR2 bei HT29 und Caco2 auf inflammatorische bzw. antiinflammatorische Reize zeigen. Anschließend untersuchten wir in einem weiteren Zellkulturexperiment mit HT29 und Caco2 die Reaktion von intestinalen Epithelzellen auf pathogene und apathogene Bakterienstämme näher. Mit den gewonnenen Ergebnissen dieser akuten in vitro Entzündungsreaktionen richteten wir unser Interesse nachfolgend auf die Expression von PAR2 in chronischen intestinalen in vivo Entzündungsreaktionen. Hierzu wählten wir ein ebenfalls erprobtes Entzündungstiermodell, das DSS-Colitis-Modell der Maus und verglichen die Expression bei akuten und chronischen Entzündungsstadien miteinander.

Um weitere Erkenntnisse über das Expressionsverhalten von PAR2 in Entzündungsreaktionen zu gewinnen, folgte nach den Untersuchungen des Expressionsmusters von PAR2 bei der DSS-Colitis der Maus die Untersuchung von humanen Dünndarm- und Dickdarmproben. Hier fiel unser Focus auf die chronisch

entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa, bei denen wir die Expression von PAR2 mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Da bei beiden Erkrankungen die genaue Ursache noch nicht eindeutig geklärt ist, jedoch bei beiden Erkrankungen Theorien über eine abnorme Immunreaktion diskutiert werden, könnten die Ergebnisse unserer Studien, falls eine Veränderung der PAR2 Expression mit einer nachfolgend von der physiologischen Entzündungsreaktion abweichenden Immunantwort nachgewiesen würde, einen Erklärungsansatz für die Auslösung einer Autoimmunerkrankung bieten und möglicherweise zukünftig über die selektive Blockierung des Rezeptors auch für die Therapie von entzündlichen Erkrankungen von Bedeutung sein.

2. Allgemeine Materialien

Für die Punkte 2.1.1. bis 2.2.9. wurden folgende Pipetten (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 2ml Art.Nr.710180, 5ml Art.Nr.606180, 10ml Art.Nr.607180, 25ml Art.Nr.760180 und 50ml Art.Nr.768160) in Verbindung mit einem Pipetboy (Integra Biosciences ⁽¹⁵⁾) eingesetzt. Zudem sind Pipetten mit Volumina zwischen 0,2µl und 1000µl (Eppendorf ⁽⁷⁾, Research, 0,1-2,5µl Art.Nr.3111 000.114, 0,5-10µl Art.Nr.3111 000.122, 10-100µl Art.Nr.3111 000.149, 10-1.000µl Art.Nr.3111 000.165) und Filterpipettenspitzen (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 10µl Art.Nr.765288, 100µl Art.Nr.772288, 1000µl Art.Nr.740288) verwendet worden.

2.1. Spezifische Materialien

2.1.1. Zellkultur

Folgenden Zelllinien wurden für die Arbeit verwendet:

Bei HT-29 handelt es sich um eine Zelllinie, welche 1964 aus einem Primärtumor eines Kolon-Adenokarzinoms einer 44-jährigen kaukasischen Frau isoliert wurde. Der Tumor wurde als gut differenziertes Grad I Adenokarzinom (Tumorgrading; >95% des Tumors bestehen aus glandulärem Anteil) beschrieben (26, 30, 33, 56).

Die Zelllinie ist über Dr. H. G. Drexler, DSMZ, Braunschweig, Germany bezogen worden.

HT-29 wächst als Monolayer mit adhärenenten Epithelzellen in großen Kolonien. Als Kulturmedium wurde 90%iges McCoy's 5A Medium (Gibco Invitrogen Corporation ⁽⁹⁾, Cat.Nr. 26600-023, Lot. 3072937) mit 10% SERA Plus FBS (PAN Biotech GmbH ⁽²⁴⁾, Cat.Nr.3702 P 221107, Lot. P221107) verwendet. Die Zellen wurden alle 4 Tage in einem Verhältnis von 1:3 oder 1:5 gesplittet. Dafür ist ein Gemisch aus Trypsin (0,5mg/ml) und EDTA (0,22mg/ml), 1:250, eingesetzt worden (PAA Laboratories GmbH ⁽²³⁾, Trypsin/EDTA, Art.Nr.L11-660 Lot.Nr.H04123-031). Bei jeder Passage konnten zwischen 1×10^4 und 2×10^4 Zellen/cm² ausgesät werden. HT29 wurden bei 37°C mit einem CO₂-Anteil von 5% inkubiert. Die Verdopplungsrate der Zellen betrug ca. 40-60 Stunden.

Caco-2 ist ebenfalls eine Kolon-Adenokarzinom Zelllinie, die 1972 aus dem Adenokarzinom eines 72 Jahre alten kaukasischen Mannes isoliert wurde (26, 30). Die Zelllinie wird von Herrn Prof. A. Bacher, Technische Universität München, Germany verwahrt.

Es handelt sich um adhärent wachsende Epithelzellen, die nach dem Splitten zunächst in kleinen Kolonien zu wachsen beginnen. Das verwendete Zellkulturmedium ist 80%iges Earl's MEM (PAA Laboratories GmbH ⁽²³⁾, 500ml, Cat.Nr.E15-825, Lot.Nr. E05822-630) und 20% SERA Plus FBS (PAN Biotech GmbH ⁽²⁴⁾, Cat.Nr.3702 P 221107, Lot. P221107) und NEAA MEM (100x) (Non-Essential Amino Acids, Gibco Invitrogen Corporation ⁽⁹⁾, Cat. 11140-035, Lot. 3066694). Die Zellen wachsen langsam und wurden bei Konfluenz 1:6 bzw. 1:10 alle 5 Tage gesplittet. Da die Zellen stark an der Oberfläche der Kulturflasche hafteten, wurde zum Splitten neben Trypsin und EDTA ein Zell-Scraper eingesetzt. Bei jeder Passage wurden ca. 1×10^4 bis 2×10^4 Zellen/ cm^2 in 10 ml Medium ausgesät und bei 37°C mit 5%igem CO₂-Anteil inkubiert. Die Verdopplungsrate betrug für Caco-2 ca. 80 Stunden.

Für die Zellkultur von HT29 und Caco2 wurden die nachfolgenden Materialien verwendet.

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden unter einem Laborabzug (Heraeus instruments ⁽¹³⁾, LaminAir HB 2448) geöffnet und gemischt bzw. auf die Zellen gegeben. Pipettiert wurde mit einem Pipetboy acu (Integra Biosciences ⁽¹⁵⁾) in Verbindung mit einer Absaugvorrichtung/ Vakuumpumpe zum Absaugen der Medien und Zellverbindungen.

Außerdem wurden Zellkulturflaschen mit 250ml, 75cm² (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, Tissue Culture Flasks, non pyrogenic mit Filtercaps, Art.Nr.658175), 550ml, 175cm² (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, Tissue Culture Flasks, non pyrogenic mit Filtercaps, Art.Nr.660175) und 6-Well Platten (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, Tissue Culture Plate, Art.Nr.657160) verwendet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Heraeus instruments ⁽¹³⁾, Typ BB 6220, Art.Nr.51007484) inkubiert. Zum Splitten der Zellen wurden 15ml und 50ml Probenröhrchen (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 15ml Art.Nr.188261, 50ml Art.Nr.227261) benutzt.

Alle Medien und Zusätze wurden in einem Kühlschrank (Liebherr ⁽¹⁸⁾, Profi Line) bei 4°C gelagert.

Für HT29 stellte Mc Coy's 5A Medium (Gibco Invitrogen Corporation. ⁽⁹⁾, 500ml, Cat.Nr. 26600-023, Lot.Nr. 3072937) das Grundmedium dar. Zuerst wurden dem Grundmedium 55ml entnommen. Danach wurden 5ml Penicillin (10000 U)/ Streptomycin (10mg/ml) (PAA Laboratories GmbH ⁽²³⁾, Cat.Nr.P11-010, Lot.NR. L 11121-298) zugesetzt, um eine Antibiotikaendkonzentration von 1% zu erreichen. Aus

dem Grundstock Penicillin/Streptomycin wurden dazu 5ml mit einer Pipette (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 5ml, Art.Nr.606180) aufgenommen und in das Kulturmedium gegeben. Im letzten Schritt wurden dem Medium 50ml Fetal Bovin Serum, FBS (PAN Biotech GmbH ⁽²⁴⁾, Cat.Nr.3702 P 221107, Lot.Nr. P221107) hinzugefügt.

Das Grundmedium für Caco2 war Earl's MEM (PAA Laboratories GmbH ⁽²³⁾, 500ml, Cat.Nr.E15-825, Lot.Nr. E05822-630). Dem Medium wurde, wie bei HT29, Antibiotikum und FBS zugesetzt. Bei dem Antibiotikum handelt es sich, wie bei HT29, um Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH ⁽²³⁾, Cat.Nr.P11-010, Lot.Nr. L 11121-298). Im Gegensatz zu HT29 wurde bei Caco2 das Grundmedium statt mit 10% FBS mit 20% FBS ergänzt. D.h. es wurden, statt 50 ml FBS, 100 ml FBS hinzugefügt. Dadurch erhöhte sich bei gleicher Konzentration von Penicillin/Streptomycin das Antibiotikavolumen von 5 ml auf 6 ml. Für bestimmte Experimente wurde von diesem Schema abgewichen. In diesen Fällen wurde auf den Zusatz von Antibiotikum verzichtet bzw. das Medium durch ein weiteres Antibiotikum ergänzt. Dies wird bei den entsprechenden Experimenten jedoch gesondert erwähnt.

Zum Splitten der Zellen wurde der Waschpuffer Phosphat Buffered Saline (PBS) verwendet. Dieser wurde im Labor aus Einzelkomponenten hergestellt.

Zunächst benötigte man di-Natriummonohydrogenphosphat (Na_2HPO_4 , $M=141,96\text{g/mol}$, Merck ⁽²⁰⁾, Art.Nr.106585) oder Mononatriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M=156,02\text{ g/mol}$, Merck ⁽²⁰⁾, Art.Nr.106342). Je nach verwendetem Ausgangsprodukt wurde eine 1M Lösung hergestellt. Zunächst wurde die Masse mit einer Waage (Mettler ⁽²¹⁾, Typ AE163) abgewogen, die einem Mol entspricht. Dies waren für Na_2HPO_4 141,96g bzw. für NaH_2PO_4 156,02g. Ein Mol des Ausgangsstoffes wurde dann unter keimarmen Bedingungen unter dem Laborabzug bei 25°C in 1 Liter destilliertem H_2O (Fresenius ⁽⁸⁾, PZN 1214482) gelöst. Das Volumen wurde zuvor im Standzylinder (Simax) abgemessen. Der Puffer musste anschließend auf einen pH Wert von 7,4 eingestellt werden. Dies geschah mittels 1M NaOH (Merck ⁽²⁰⁾, Art.Nr.1824) und 1M HCL (Merck ⁽²⁰⁾, Art.Nr.1789) mit einem Standard pH-Meter (Knick, pH-Meter Typ 761 Calimatic). Dabei wurde das pH-Meter in die Lösung eingeführt. Je nach Abweichung vom pH=7,4 fügten wir HCl zur Verringerung bzw. NaOH zur Erhöhung des pH-Wertes zunächst in 1ml Schritten hinzu. Es sollte darauf geachtet werden, wie der pH-Wert der Lösung auf die Zugabe reagiert. Gegen Ende der pH-Einstellung werden die Volumina an Säure oder Base, die zu einer Veränderung des

pH-Wertes benötigt werden immer kleiner. Daher sollten gegen Ende kleinere Volumina, z.B. 500µl, zugegeben und die Zeiträume zwischen den Zugabeschritten verlängert werden, um die pH-Wert Veränderung der Lösung genau zu erkennen. Anschließend sterilisierten wir den Puffer im Autoklaven (Systec ⁽³⁰⁾, Typ 3850EL).

2.1.2. DSS–Kolitis–Maus–Modell

Die Versuchstiere des Entzündungsmodells wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Florian Obermeier, Zentrum für Innere Medizin der Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt. Die Experimente wurden dort vorbereitet und durchgeführt. Wir übernahmen die Tiere am Tag der Epithelzell–Isolation.

Für die Experimente wurden weibliche Mäuse der Spezies Balb/c eingesetzt. Bei den Tieren induzierte die Arbeitsgruppe in Regensburg mittels DSS (Dextran Sulfat Sodium Salt, ICN Biomedicals ⁽¹⁴⁾, Art.Nr.160110) eine chemische Kolitis. Dabei wurde zur Induktion einer akuten Kolitis mit 3%iger DSS-Lösung und bei der chronischen Kolitis mit 2%iger DSS-Lösung gearbeitet.

Bei den verwendeten Proben der Maus handelt es sich um aus komplettem Dünn- bzw. Dickdarm gewonnene Epithelzellen. Für die Isolierung der Epithelzellen fanden folgende Puffer Verwendung. Unter anderem Phosphat Buffer Saline (PBS), HBSS(1x) /2mM EDTA (Hank's Balanced Salt Solution HBSS(1x) (Gibco Invitrogen Corporation. ⁽⁹⁾, 500ml, Art.Nr.14170-088)/ 2mM Calcium-Dinatrium-Ethylen-diamin-tetraacetat, (Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾, 100g, Art.Nr.ED2SC)) und PBS/ 1mM DTT (Phosphat Buffer Saline (PBS)/1mM DiThioThreitol (DTT) (Sigma-Aldrich ⁽²⁹⁾, 1g, Art.Nr.D9779)). Der PBS-Puffer wird, wie zuvor im Teil Material/Zellkultur beschrieben, angefertigt. Der HBSS-Puffer wird bereits anwenderbereit geliefert. EDTA musste zuvor in Lösung gebracht werden. Mittels Waage (Mettler ⁽²¹⁾, Typ AE163) wurden 2mmol entsprechend 748,6mg abgewogen und anschließend in einem Liter destilliertem Wasser (Fresenius ⁽⁸⁾, PZN 1214482) gelöst und im Autoklaven (Systec ⁽³⁰⁾, Typ 3850EL) autoklaviert. Der pH-Wert der EDTA – Lösung stellt sich bei 8,0 ein. Für den PBS/1mM DTT Puffer werden 1mmol DTT entsprechend 154,2mg mit der Waage (Mettler ⁽²¹⁾, Typ AE163) abgewogen und nachfolgend in einem Liter autoklaviertem PBS-Puffer gelöst.

Für die Epithelzell-Isolation wendeten wir zudem sterile Pipetten (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 100µl Art.Nr.772288, 2ml Art.Nr.710180, 5ml Art.Nr.606180, 10ml

Art.Nr.607180), 15ml und 50ml Probenröhrchen (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 15ml Art.Nr.188261, 50ml Art.Nr.227261), Skalpelle (B.Braun, Cutfix, Art.Nr.5518067), Rüttelplatte (Heidolph Instruments GmbH ⁽¹¹⁾, Unimax 2010) und Vortexer (Heidolph Instruments GmbH ⁽¹¹⁾, Reax 1DR) an.

2.1.3. Patientenproben

Bei den Proben handelt es sich um Biopsie-Proben mit einem maximalen Volumen von 2mm^3 . Die Proben wurden in Form von $10\text{ng}/\mu\text{l}$ cDNA aus Stuttgart (IKP-Stuttgart, Robert Bosch Klinikum, Dr. M. Schmid) bezogen und jede Probe einzeln mittels quantitativer Real-Time-PCR mit dem entsprechenden Primer/Probe Gemisch gemessen. Anschließend bestimmten wir von den jeweiligen Expressionsraten der gemessenen Gene der einzelnen Gewebeproben die Mittelwerte bzw. bestimmten die Signifikanz der erhaltenen Messwerte und stellten diese graphisch dar.

2.1.4. Stimulation

2.1.4.1. Stimulation HT29 und Caco2 mit Zytokinen

Für die Zellstimulation von HT29 und Caco2 wurden die Cytokine IL1 β (Roche ⁽²⁷⁾, 68305 Mannheim, Deutschland, Art.Nr.1457756), TNF α (Roche ⁽²⁷⁾, 68305 Mannheim, Deutschland, Art.Nr.1371843); IFN γ (Roche ⁽²⁷⁾, Art.Nr.1050494) und LPS (Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾, Art.Nr.F3665), IL1 β in Kombination mit Dexamethason (Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾, Dexamethason, $M=392,5\text{ g/mol}$, Art.Nr.D4902) und Dexamethason allein, verwendet. Diese mussten zuvor auf eine für das Experiment vorgesehene Endkonzentration eingestellt werden. Für IL1 β betrug diese $c_{(\text{IL1}\beta)}=0,3\text{ng/ml}$, für TNF α $c_{(\text{TNF}\alpha)}=3\text{ng/ml}$, für IFN γ $c_{(\text{IFN}\gamma)}=25\text{ng/ml}$, für LPS $c_{(\text{LPS})}=30\text{ng/ml}$, für IL1 β /Dexamethason $c_{(\text{IL1}\beta/\text{Dexamethason})}=0,3\text{ng/ml} + 1 \times 10^{-7}\text{M}$ und Dexamethason mit $c_{(\text{Dexamethason})}=1 \times 10^{-7}\text{M}$. Gemäß der Formel für die Konzentration ($c=m / V$) konnte mittels des Volumens und der Konzentration die benötigte Masse ($m=c \times V$) berechnet werden. Das Ausgangssubstrat für IL1 β lag in einer Konzentration von $c_{(\text{IL1}\beta\text{-Ausgang})}=2\mu\text{g/ml}$ vor. Da wir bei einer Endkonzentration von $0,3\text{ng/ml}$ ein Endvolumen von 12ml benötigten, sind in der 12ml Lösung $3,6\text{ng}$ IL1 β enthalten. Bei einer Ausgangskonzentration von $c_{(\text{IL1}\beta\text{-Ausgang})}=2\mu\text{g/ml}$ bzw. 2000ng/ml musste nun das Volumen an IL1 β bestimmt werden, welches $3,6\text{ ng}$ enthält. Die Berechnungsgrundlage

bildete der Dreisatz mit dessen Hilfe sich das Volumen berechnen ließ. Bei 2000 ng/1000 μ l = 3,6 ng/x μ l, und Umstellen nach x konnte das Volumen welches 3,6 ng IL1 β enthält ermittelt werden. X ist in diesem Fall 1,8 μ l. Dieses Volumen wurde nun im Endvolumen 12ml gelöst, wobei die erforderliche Endkonzentration von 0,3 ng/ml vorlag. Nach dem gleichen Verfahren wurden auch die Konzentrationen der anderen Zytokine berechnet und eingestellt. Es ergaben sich unterschiedliche Ausgangskonzentrationen bzw. Ausgangszustände für die einzelnen Zytokine, TNF α $c_{\text{(TNF}\alpha\text{-Ausgang)}}=10\mu\text{g/ml}$, IFN γ $c_{\text{(IFN}\gamma\text{-Ausgang)}}=50\mu\text{g/ml}$, LPS $c_{\text{(LPS-Ausgang)}}=2\mu\text{g/ml}$ und Dexamethason, $M=392,5\text{ g/mol}$, 25mg in Pulverform.

Für Dexamethason war es erforderlich, die Masse zuvor abzuwiegen, die 1mmol entspricht. Bei einer molaren Masse von 392,5g sind dies 392,5mg. Da wir $1 \times 10^{-7}\text{M}$ bzw. $1 \times 10^{-4}\text{mM}$ benötigten, wurde zunächst 1mM, 392,5mg, in 1ml gelöst und über zwei Verdünnungsschritte auf $1 \times 10^{-4}\text{mM}$ eingestellt.

2.1.4.2. Stimulation HT29 und Caco2 mit Bakterien

Alle in den Experimenten verwendeten Bakterien stellte uns Dr. S. Zimmermann freundlicherweise zur Verfügung. Die Experimente führten wir mit seiner Unterstützung im Zentrum für Mikrobiologie der Universität Marburg durch.

Für die Zellstimulation mit Bakterien wurden *Enterococcus faecium* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 700790), *Escherichia coli* - O157 EHEC (klinisches Isolat), *Escherichia coli* Nissle 1917 (Ardeypharm GmbH, 58313 Herdecke, Germany), *Salmonella typhi* (Medical Culture Collection Marburg – MCCM 01631), *Listeria monocytogenes* 4b (ATCC 19115, klinisches Isolat) und *Yersinia enterocolitica* 08 (Medical Culture Collection Marburg – MCCM 01839), verwendet.

2.1.5. RNA-Isolierung

Für unsere Versuchsreihe verwendeten wir die oben genannten Pipetten in Verbindung mit ebenfalls oben genannten Filterpipettenspitzen. Außerdem wurden Eppendorf Cups (Eppendorf ⁽⁷⁾, 22339 Hamburg, Safe-Lock, 2ml, farblos, Art.Nr.0030 120.094) oder Cups der Marke Sarstedt (Sarstedt ⁽²⁸⁾, 500 Reagiergefäße, 1,5ml, No./REF 72.690) eingesetzt. Das Mischen durch Vortexen erfolgte mit einem Gerät der Marke Heidolph, (Heidolph Instruments GmbH ⁽¹¹⁾, Typ Reax 1DR). Wir benutzten eine Zentrifuge

(Eppendorf ⁽⁷⁾, 22339 Hamburg, Centrifuge 5417R, Art.Nr.5407 000.317) mit maximal 14000 Umdrehungen pro Minute.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit einem Kit der Firma Quiagen (Quiagen ⁽²⁵⁾, 40724 Hilden, Deutschland, RNeasy Mini Kit, Cat.Nr. 74104), bestehend aus 50 RNeasy Mini Columns, 50 Collection Tubes (1,5ml), 50 Collection Tubes (2ml), RNase Free Water (10ml), RLT Lysis Buffer (45ml), RPE Wash Buffer (11ml), RW1 Wash Buffer (45ml). Der RPE Buffer war bei Lieferung noch nicht einsatzbereit. Vor der ersten Benutzung musste der RPE Buffer noch mit 44ml Alkohol abs. versetzt werden.

Weiter benötigte man für die RNA Isolierung β -Mercaptoethanol (Merck ⁽²⁰⁾, 64293 Darmstadt, 50ml, ZA 1573506-541). β -Mercaptoethanol (Merck ⁽²⁰⁾, 50ml, ZA 1573506-541) mischten wir im Verhältnis 1:100 mit dem RLT Puffer. D.h. zu 600 μ l RLT-Buffer wurden 6 μ l β -Mercaptoethanol (Merck ⁽²⁰⁾, 64293 Darmstadt, 50ml, ZA 1573506-541) in ein Eppendorf Cup gegeben. Dieses Gemisch wurde kurz gevortext und konnte so für die nächsten 4 Wochen gebrauchsfertig bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden. Außerdem setzten wir zur RNA Isolierung ein RNase Free DNase Set (Quiagen ⁽²⁵⁾, Art.Nr. 79254), das aus DNase, RNase Free Water und RDD Buffer bestand. Die in Pulverform gelieferte DNase wurde mit dem RNase Free Water in Lösung gebracht und erreichte so bei 4°C im Kühlschrank eine Haltbarkeit von 4 Wochen. Vor der Anwendung für die RNA-Isolierung mussten je 10 μ l der gelösten DNase mit je 70 μ l RDD Buffer versetzt werden.

2.1.6. cDNA Synthese

Auch für die cDNA Synthese wurden oben genannte Pipetten und Pipettenspitzen verwendet. Wie bei der RNA Isolierung, nutzten wir denselben Vortexer (Heidolph Instruments GmbH ⁽¹¹⁾, Typ Reax 1DR) und dieselbe Zentrifuge (Eppendorf ⁽⁷⁾, 22339 Hamburg, Centrifuge 5417R, Art.Nr.5407 000.317).

Für die cDNA-Synthese verwendeten wir einen Kit der Firma Fermentas (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, Revert Aid First Strand cDNA Sythesis Kit (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, Art.Nr.1622). Dieser enthält 1,5ml destilliertes Wasser, 120 μ l Random Hexamer Primer (0,2 μ g/ml), 120 μ l Ribonuclease Inhibitor (20U/ μ l), 250 μ l dNTP Mix (10mM), 240 μ l M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/ μ l), 40 μ l Control Primer (10pmol/ μ l) und 120 μ l Oligo (dT) 18 Primer (0,5 μ g/ μ l). Die cDNA Synthese wurde in einem Thermocycler (Landgraf Laborgeräte ⁽¹⁷⁾, Typ - Varius V) durchgeführt. Die

Temperatur- und Zykluseinstellungen wurden den Anweisungen der Firma MBI-Fermentas entsprechend am Thermocycler vorgenommen. Diese werden im Teil Methoden 2.2.6. genauer beschrieben.

2.1.7. Quantitative Real-Time-PCR

Für die Quantitative Real-Time-PCR wurden folgende Materialien benutzt:

96 Well Optical Reaction Plate (Part.Nr.4306737) der Firma Applied Biosystems ⁽²⁾ in Kombination mit Optical Caps (Part.Nr.4323032) und das ABI Prism 7700 Sequence Detection System desselben Herstellers.

Auch für die Quantitative Real-Time-PCR nutzten wir bei der RNA-Isolierung und der cDNA-Synthese die gleichen Pipetten und Pipettenspitzen, dieselbe Zentrifuge (Eppendorf ⁽⁷⁾, Centrifuge 5417R Art.Nr.5407 000.317) und denselben Vortexer (Heidolph Instruments GmbH ⁽¹¹⁾, Typ Reax 1DR).

Die eingesetzten Primer bzw. fluoreszierenden Gensonden (Probes) wurden zuvor individuell gefertigt. Verwendet wurden Primer und Probes von Applied Biosystems ⁽²⁾ und Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾ / Sigma - Geniosys ⁽²⁹⁾. Die quantitative PCR wurde außerdem mit einem Kit von Applied Biosystems ⁽²⁾, TaqMan Universal PCR Master Mix (Part.Nr.4304437), welcher AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AMPErase UNG, dNTPs (Nucleotidtrisphosphate), dUNPs und optimierte Puffer enthält, durchgeführt.

Zudem wurden die Pre-Developed Assay Reagents, Human IL8 (20x) (Applied Biosystems ⁽²⁾, Art.Nr.4327042F, 4 x 125µl), Mus Musculus Cxcl2 (Applied Biosystems ⁽²⁾ Art.Nr.Mm00436450_m1), 18s Ribosomal RNA (20x) (Applied Biosystems ⁽²⁾, Art.Nr.4310875, 2 x 500µl) und Human GAPDH (Applied Biosystems ⁽²⁾, Art.Nr.402869) eingesetzt. Dabei dienten IL8 und mmCxcl2 als Marker für die Entzündungsaktivität bzw. 18s und GAPDH als Housekeeping-Gene. Bis dato ist der, dem humanen IL8 äquivalente, Ligand bei der Maus nicht bekannt. Der Ligand IL8 bindet am Chemokine Rezeptor CXCR2 (89). Aus diesem Grund haben wir einen gleichwertigen am Chemokine Rezeptor bindenden Liganden, mmCxcl2 genannt, ausgewählt und damit die RNA bei den DSS-Kolitis-Maus Proben gemessen.

Alle Untersuchungen mittels quantitativer Real-Time-PCR wurden mit Molecular Biology Grade Water (1 Liter, Eppendorf ⁽⁷⁾, Art.Nr.0032006.159) durchgeführt.

2.1.8. Konventionelle PCR

Für die konventionelle PCR benötigten wir dieselben Primer wie für die quantitative Real-Time-PCR, durchgeführt. Zusätzlich wurden eine TaqDNA Polymerase (Roche ⁽²⁷⁾, Art.Nr.1146173), 10xBuffer + Mg (Roche ⁽²⁷⁾, Art.Nr.1271318) und ein dNTP-Mix (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, Art.Nr.R0192) eingesetzt. Wir benutzten Eppendorf Cups (Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, 500µl, farblos, Art.Nr.0030-121.023) und für die PCR einen Thermocycler der Firma Landgraf (Landgraf Laborgeräte ⁽¹⁷⁾, Varius V).

2.1.9. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein Agarose-Gel verwendet, das, je nach nachzuweisendem Produkt bzw. dessen Anzahl an Basenpaaren, eine Konzentration zwischen 1% und 3% besaß. Bei PCR-Produkten die aus 100 bis 250 Basenpaaren bestehen, nutzten wir Agarose-Gele mit einer Konzentration von 3%, bei PCR-Produkten mit mehr als 1000 Basenpaaren dagegen Agarose-Gel-Konzentrationen von 1%. Da die meisten PCR-Produkte unserer Experimente zwischen 50 und 150 Basenpaaren enthielten, wurde eine Agarose (Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾, Art.Nr.A2790) eingesetzt, die für die von uns verwendeten Peptide und deren Anzahl an Basenpaaren geeignet war. Diese konnte DNA Fragmente zwischen 50 und 1000 Basenpaaren separieren. Für die Gelelektrophorese kam ein TBE-Puffer (BioRad ⁽⁴⁾, 10x Tris/Boric Acid/EDTA (TBE), 1L, Art.Nr.161-0733) zum Einsatz der zuvor noch verdünnt werden musste. Die Gelelektrophorese wurde in einer Gelelektrophoresekammer (Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾, Typ SHU13) und einer Stromquelle (BioRad ⁽⁴⁾, Modell 200/2.0 Power Supply) durchgeführt. Die Abdichtung der Gelkammer bei der Herstellung des Gels erfolgte mithilfe von Tesaband (Tesa ⁽³¹⁾, Extra Power Gewebiband).

Die cDNA wurde mit Ethidiumbromid (Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾, 10ml, Art.Nr.E1510) im Gel markiert. Des Weiteren wurde die cDNA für die Verlaufskontrolle der Elektrophorese mit einem Farbstoff (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, 6x Loading Dye Solution, Art.Nr.R0611) in Eppendorf Cups (Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, 500µl, farblos, Art.Nr.0030-121.023) angefärbt. Um die Größe des PCR-Produktes abschätzen zu können, diente uns als Referenz ein GeneRuler (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, Art.Nr.SM0241). Dieser enthielt Fragmente von 80, 100, 200 usw. Basenpaaren. Die Auswertung des Gels geschah unter UV-Licht (MWG Biotech ⁽²²⁾) und wurde mit Kamera und Drucker (Biophotonics Corp. ⁽⁵⁾, Gelprint 1000i) dokumentiert.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Bei den Versuchen splitteten wir die Zellen je nach Zelllinie bei Konfluenz. Primär sollten alle Medien und verwendeten Lösungen zuvor einige Minuten bei Raumtemperatur belassen werden.

Der Zellrasen wurde durch Zugabe und anschließendem Absaugen von 5ml PBS gewaschen. Hierzu gaben wir 5ml PBS auf die Zellen und entfernten es anschließend wieder. Nachfolgend fügten wir 2ml eines Gemisches aus Trypsin und EDTA im Verhältnis 1:250 (PAA Laboratories GmbH ⁽²³⁾, Trypsin/EDTA, Art.Nr.L11-660 Lot.Nr.H04123-031) hinzu und beließen es für 3 Minuten bis zum Ablösen der Zellen vom Untergrund, auf dem Zellrasen. Nach Zugabe von 8ml Medium wurde die Zellsuspension anschließend in einem 50ml Röhrchen (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 15ml Art.Nr.188261, 50ml Art.Nr.227261) mit 1200U/min zentrifugiert und danach das, über dem Zellpellet stehende Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit 10ml Medium resuspendiert.

Um die genaue Zellzahl zu bestimmen, wurden 10µl der Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer (Kobe ⁽¹⁶⁾, Tiefe 0,1mm, Art.Nr. 9.161 078) gegeben. Dabei zählten wir alle 9 Quadrate der vier Quadranten der Zählkammer und berechneten anschließend den Mittelwert aus diesen vier Quadranten. Die erhaltene Zellzahl entsprach der Anzahl an Zellen aus 1µl Zellsuspension. Nachfolgend wurde das Ergebnis auf das Gesamtvolumen der Resuspension hochgerechnet und damit das auszusäende Volumen bestimmt.

Das berechnete Volumen wurde für die nächste Passage in einem Gesamtvolumen von 10ml Medium ausgesät.

2.2.2. DSS–Kolitis–Maus–Modell

Die Tierexperimente erfolgten, wie schon angesprochen, mit freundlicher Unterstützung von Dr. Obermeier, Zentrum Innere Medizin, Universität Regensburg. Dabei wurden die Tierexperimente durch die Arbeitsgruppe um Dr. Obermeier durchgeführt. Die Tiere übernahmen wir kurz vor der Isolation der Epithelzellen.

Bei weiblichen Mäusen der Spezies Balb/c wurde mittels DSS (Dextran–Sulfat–Natrium–Salt, ICN Biomedicals ⁽¹⁴⁾, Art.Nr.160110) eine chemische Kolitis induziert.

Dies wurde erreicht, indem das Trinkwasser der Tiere mit einer definierten Menge DSS versetzt wurde. Vor Beginn des Versuches wiesen die Tiere ein Mindestgewicht von 20g auf.

Dextran–Sulfat–Natrium–Salz verursacht eine Zerstörung der epithelialen Barrierefunktion und eine Entzündung der Mukosa mit Verlust des Kryptenreliefs und Nekrosen neben Bereichen unveränderter Oberfläche (65), die bei den Versuchstieren einen Gewichtsverlust und sichtbar blutige Durchfälle hervorriefen. Die Tiere waren in diesem Zustand deutlich aktivitätsgemindert und wiesen ein struppiges Fell auf. Während die Darmlänge eines gesunden Tieres etwa 14cm betrug, zeigten Tiere mit chemischer Kolitis eine Verkürzung des Darmes auf eine Länge von nur 7-9 cm.

Im chronischen DSS–Kolitis–Modell erfolgte die Zugabe von 2%igem DSS zum Trinkwasser in Zyklen jeweils für 7 Tage. Mit einem Abstand von 10 Tagen wurde der nächste Zyklus gestartet. Insgesamt durchliefen die Tiere 4 Versuchszyklen. Nach dem letzten Zyklus wartete man noch 4 Wochen, damit eine Chronifizierung der Kolitis eintrat. Diese hielt dann für ca. 6-8 Wochen an.

Die Symptome der Tiere klangen zwischen den einzelnen Zyklen ab. Die Tiere zeigten im Vergleich zur akuten Kolitis keinen Gewichtsverlust, wiesen jedoch äußerlich deutliche Zeichen einer Kolitis mit struppigem Fell und Aktivitätsverlust auf. Der Kot war weicher und ungeformt, aber nicht blutig. Der Darm war im Durchschnitt auf 11cm verkürzt und ließ eine sichtbare Veränderung der Gewebestruktur erkennen. Dies wurde unter anderem durch die Ausbildung von Pseudopolypen sichtbar.

Zunächst wurden die Mäuse mittels Kohlenstoffmonoxid betäubt und anschließend getötet. Durch einen Längsschnittes öffneten wir das Abdomen des Tieres und suchten anschließend den Übergang des Magens in das Duodenum auf. An dieser Stelle trennten wir den proximale Dünndarmanteil vom Magen. Nachfolgend stellten wir distalen Dickdarmanteil dar, indem wir den Darm dorsal der Blase freipräparierten. Dies ermöglichte die Darstellung der Trennstelle des distalen Dickdarmabschnittes. Es empfiehlt sich vor Entnahme den kompletten Darm vom Mesenterium zu lösen, um sich die Arbeit später zu erleichtern.

Nach erfolgreicher Entfernung des kompletten Darmes erfolgte jetzt die Trennung von Dünn- und Dickdarm. Hierfür wurde zunächst der ileozökale Übergang aufgesucht und der Darm an dieser Stelle durchtrennt.

Anschließend teilten wir die verschiedenen Darmabschnitte wie Duodenum, Jejunum und Ileum beim Dünndarm und Coecum, Kolon ascendens, Kolon transversum und Kolon descendens beim Dickdarm voneinander.

Zur Reinigung des Darmes verwendeten wir PBS-Puffer. Vorsichtig wurde mit einer 10ml Spritze der Firma Braun Melsungen und einer darauf montierten stumpfen Kanüle oder gelben Pipettenspitze mit PBS gespült. Die Spülung erfolgte von proximal nach distal, wobei die Pipettenspitze in das Darmlumen vorgeschoben wurde. Man versuchte durch minimalen Druck das Darmlumen freizuspülen. Genauso wurde mit dem Dickdarm verfahren. Der nun primär gereinigte Darm wurde auf eine Klinge einer kleinen Präparierschere oder eine gelbe Pipettenspitze aufgefädelt und aufgeschnitten. Dies ist wichtig, um die Längsdarmeröffnung leichter durchführen zu können und alle Schichten des Darmes mit einem sauberen Schnitt zu durchtrennen. Anschließend wurde der aufgeschnittene Darm nochmals in ca. 1cm Lange Stücke zerteilt. Die Darmschnitte wurden wiederholt in einer Petrischale mit PBS Lösung gespült. Anschließend wurde die Lösung verworfen, durch eine frische PBS/ 1mM DTT ersetzt und in einem Erlenmyerkolben oder 50ml Probenröhrchen (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 50ml Art.Nr.227261) für 15 Minuten auf einer Rüttelplatte bei 225 Umdrehungen pro Minute und 37°C belassen. Durch diese Prozedur konnte der Schleim des Darmes entfernt werden. Anschließend wurde der Schleim und DTT mit PBS abgespült und das Darmstück in ein neues 50ml Probenröhrchen (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, 50ml Art.Nr.227261) gegeben. Zum Lockern der Oberflächenepithelen wurde die Mucosa in 10ml HBSS / 2mM EDTA(Endkonzentration) bei 37°C 10 Minuten bei 225 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Zum Ablösen der Epithelzellen wurde das Dünndarmstück 5 Sekunden bei 37°C in 10 ml PBS gevortext. In dieser kurzen Zeit und der damit relativ kurzen mechanischen Belastung lösten sich vornehmlich Villusepithelzellen. Diese befanden sich im Überstand. Um die Vitalität der Epithelzellen zu verifizieren, mischten wir 250µl des Überstandes mit 25µl Trypanblau und untersuchten sie auf einem Objektträger unter dem Mikroskop. Mikroskopisch konnte nun die Vitalität der Zellen analysiert werden. Viele blaue Zellen waren ein Zeichen für ein vorangegangenes Zellsterben. Für die Gewinnung von Kryptenepithelzellen wurde nach der Villusepithelzellgewinnung ca. 1-2 Minuten geschüttelt. Der Überstand wurde nach jedem Vortexen abgetrennt und durch einen neuen Puffer ersetzt. Dies wurde solange wiederholt, bis sich die Lösung nicht weiter trübte.

Um einen Untergang der Epithelzellen zu vermeiden, lagerten wir diese zunächst auf Eis, dann bei -20°C und später bei -80°C .

Die RNA aus diesen Zellen wurde, wie in Kapitel 2.2.5. beschrieben, mit dem RNeasy Kit der Firma Quiagen isoliert.

Aus der isolierten RNA wurde nachfolgend mittels quantitativer real time PCR die Expression von unterschiedlichen Genen gemessen.

2.2.3. Patientenproben

Wie bereits erwähnt bezogen wir die cDNA der Patientenbiopsien aus Stuttgart. Die Proben wurden im Robert Bosch Klinikum durch die Arbeitsgruppe um Dr. Schmid zu Beginn mit einem Skalpell Größe 11 (Dr. Junghans medical ⁽⁶⁾, Art.Nr.8902481) in möglichst kleine Teile zerlegt und anschließend in ein 2ml Eppendorf Cup gegeben, mit 600 μl RLT und 1% 2-Mercaptoethanol versetzt und mittels Ultraschallsonde (B.Braun ⁽³⁾, LabSonicU Art.Nr.853972/3) weiter zerkleinert. Aus dem erhaltenen Lysat wurde dann, wie im Kapitel 2.2.5. beschrieben, mittels Quiagen Kit die RNA isoliert. Bereits in Stuttgart untersuchte man die Proben histopathologisch, um das Ausmaß der Entzündung zu bestimmen.

2.2.4. Stimulation

2.2.4.1. Stimulation von Caco2 und HT29 mit Zytokinen

Die Stimulation der Zelllinien HT29 und Caco2 wurde mit den zuvor erwähnten Zytokinen $\text{IL1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, LPS und Dexamethason durchgeführt.

Zur Vorbereitung des Experimentes mussten zunächst genügend Zellen zur Verfügung gestellt werden. Für den gesamten Versuchsaufbau wurden ca. $1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$ Zellen benötigt.

Bei Konfluenz in 75cm^2 Zellkulturflaschen wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben gesplittet und das Volumen des Resuspensates bestimmt, welches ca. 160000 Zellen enthielt. Dieses wurde auf ein Well einer 6-Well Platte der Firma Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾ (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾ No. 657160) gegeben. Diese Zellzahl hatte sich in den verschiedenen Experimenten bewährt, da verlässlich nach 3-5 Tagen, je nach Zelllinie, Subkonfluenz erreicht wurde und mit dem Experiment begonnen werden konnte.

Es wurden, je nach zu bestimmenden Zeitpunkten, Zellen auf mindestens 6 Wells ausgesät. Dabei empfahl es sich mindestens eine 6-Well Platte (Greiner Bio One GmbH (10) Art.Nr.657160) als Sicherheit mehr anzusetzen, da möglicherweise Wells austrocknen konnten oder die Zellen nicht zu wachsen beginnen. Um optimalen Schutz vor Austrocknung des Wells zu erzielen, wurden 2ml Gesamtvolumen/ Well als Überstand gewählt. Bis zum Erreichen der Subkonfluenz vergingen je nach Zelllinie 3-5 Tage. Unter täglicher Kontrolle begann das Experiment dann bei 90%iger Konfluenz der Zellen.

Die zur Stimulation genutzten Zytokine wurden mit folgenden Endkonzentrationen eingesetzt, 0,3ng/ml IL1 β , 3ng/ml TNF α , 25ng/ml IFN γ , 30ng/ml LPS, 0,3ng/ml IL1 β /1x10⁻⁷M Dexamethason und 1*10⁻⁷M Dexamethason.

Dexamethason wurde 1 Stunde vor Zugabe von IL1 β auf die Epithelzellen gegeben.

Zunächst wurde nochmals der Konfluenzgrad der verschiedenen Wells verglichen, um mögliche, für das Experiment nicht brauchbare Wells zu verwerfen.

Jetzt wurde das überstehende Medium abgesaugt und durch das „Zytokinmediumgemisch“ ersetzt. Wie auch bei der initialen Aussaat wurde mit einem Volumen von 2ml pro Well der Zellrasen vor Austrocknung geschützt und die ausgesäten Zellen ernährt.

In den durchgeführten Experimenten wurde nach 0, 2, 4, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation die RNA isoliert. Mikroskopisch wurde zu jedem Isolationszeitpunkt der Zustand der Zellen überprüft und dokumentiert.

2.2.4.2. Stimulation von HT29 und Caco2 mit Bakterien

Für die Stimations-Experimente mit Bakterien wurde ähnlich verfahren. Jedoch wurden für die Experimente mit Bakterien wesentlich mehr Zellen als Grundstock benötigt, da der Versuchsaufbau deutlich größer war und zudem zwei Versuchsreihen parallel durchgeführt wurden.

Im ersten Versuchsaufbau wurde die Zellreaktion auf fünf verschiedene vitale Bakterienarten untersucht. Bei den im ersten Versuch eingesetzten Bakterien handelte es sich um *Enterococcus faecium* (Ecfc - ATCC 29212), *Escherichia coli* (Esco - ATCC 25922), *Yersinia enterocolitica* 08 (Yeen - MCCM 01839), *Salmonella typhi* (Saty - MCCM 01631) und *Listeria monocytogenes* (Limo - ATCC 19115, klinisches Isolat).

Im zweiten untersuchten wir zusätzlich zur Reaktion auf vitale Bakterien die Reaktion auf deren hitzeinaktivierte Bakterienbestandteile und den Überstand der Bakterienkultur. Es wurden in diesem Versuchsaufbau drei verschiedene Typen von *Escherichia coli* eingesetzt. Diese waren *Escherichia coli* (Typ: EPEC – enteropathogen - ATCC 700790), *Escherichia coli* (Typ: EHEC O157 - enterohämorrhagisch) und *Escherichia coli* (Typ: Nissle 1917).

Man benötigte für den ersten Versuchsaufbau bei 6 Messzeitpunkten mindestens fünf 6-Well Platten (Greiner Bio One GmbH⁽¹⁰⁾, Art.Nr. 657160) und beim zweiten Versuchsaufbau bei ebenfalls 6 Messzeitpunkten mindestens neun 6-Well Platten (Greiner Bio One GmbH⁽¹⁰⁾, Art.Nr. 657160).

Als Sicherheit rechneten wir eine Platte pro Zelllinie hinzu und benötigten so insgesamt 16 Platten a 6 Wells und für diese wiederum 160000 Zellen/ Well. Insgesamt sollte ein Zellstock von 16×10^6 Zellen pro Zelllinie bereitstehen. Wir begannen 2 bis 3 Wochen vor dem eigentlichen Experiment mit der Aussaat der Zellen. Durch die 3 oder 4 Passagen die zwischen der ersten Aussaat und der Aussaat in die Wells lagen, konnte so ein ausreichend großer Stock aufgebaut werden.

Die Zelllinien wurden jetzt in die Wells ausgesät. Die Zellzahl betrug, wie zuvor erwähnt, ca. 160000 Zellen pro Well. In den verbleibenden Tagen bis zur Subkonfluenz der Wells hatten wir Zeit, um die benötigten Bakterien in Kolonie zu bringen. Da wir bei der Stimulation mit Flüssigmedien arbeiteten, wurden die Bakterien in den normalen Zellkulturmedien (McCoy's 5A für HT29 und Earl's MEM für Caco2) angezüchtet. Die Medien für dieses Experiment waren zunächst frei von Antibiotika.

Als die Zelllinien zu 90% konfluent waren, konnte das Experiment gestartet werden. Da auf jedes Well 5×10^8 Bakterien gegeben wurden, musste zuvor die Bakterienkonzentration im Kulturmedium bestimmt werden. Dafür wurde eine vorher angelegte Verdünnungsreihe eingesetzt. Je nach Trübung konnte so die Bakterienzahl errechnet werden, welche sich im Kulturmedium befand. Anschließend berechnete man lediglich das Volumen, das 5×10^8 Bakterien enthielt.

In den Versuchsreihen wurde an 6 Zeitpunkten RNA isoliert. Dafür wurden 6 Wells und 2ml pro Well benötigt und ein Gesamtvolumen von 12ml mit einer Bakterienzahl von insgesamt 6×10^9 angesetzt.

Wie bereits angedeutet verfolgten wir 2 unterschiedliche Versuchsansätze.

Im ersten Versuch wurden die Zellen mit lebenden Bakterien infiziert und so stimuliert.

Der zweite Versuchsaufbau verglich die Reaktion der Zellen auf lebende Bakterien, den steril filtrierten Überstand des Kulturmediums, welches zuvor 6×10^9 Bakterien enthielt und Medium mit 6×10^9 hitzeinaktivierten Bakterien.

Für den zweiten Versuch wurden dreimal 12ml Kulturmedium verwendet. 12ml mit 6×10^9 lebenden Bakterien, 12ml mit 6×10^9 Bakterien, (die für 15 Minuten bei 100°C hitzeinaktiviert wurden) und 12ml steril filtriertes Kulturmediums, welches zuvor 6×10^9 Bakterien enthielt.

Sobald die Bakterienmedien angesetzt waren, saugten wir zunächst das normale Kulturmedium der Zelllinien ab und ersetzten es mit den schon beschriebenen Versuchsmedien. Dies kennzeichnete den Zeitpunkt 0 Stunden des Versuches. Da man bis zur nächsten Aktion im Versuchsaufbau 60 Minuten Zeit hatte, empfahl es sich jetzt die RNA des 0 Stunden Zeitpunktes zu isolieren.

Bei beiden Versuchsaufbauten wurden die Versuchsmedien bzw. Bakterien 60 Minuten auf den Zellen belassen und nach dieser Zeit durch frisches Medium ersetzt. Beim jetzt verwendeten Medium fügten wir zusätzlich zu der 1% Penicillin/ Streptomycin-Lösung noch $16\mu\text{g/ml}$ Ampicillin (Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾, Art.Nr.A5353, 100mg/ml) hinzu. Jetzt isolierten wir zunächst 2 Stunden nach Versuchsbeginn die RNA. Dabei wurde das Medium abgesaugt und die RNA der Zellen, wie in Kapitel 2.2.5. beschrieben, isoliert. Genauso verfährt man nach 4, 12 und 24 Stunden. Die erhaltene RNA sollte bei -20°C gelagert werden. Als Kontrolle für die Ausgangskonzentration der Bakterien wird eine Verdünnungsreihe der verwendeten Bakterienkonzentration 6×10^9 auf 10^2 , 10^3 und 10^4 angelegt und anschließend ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 werden die Kolonien ausgezählt und entsprechend der Verdünnung hochgerechnet. So entspricht eine Koloniezahl von 500 nach 24 Stunden, bei einer Verdünnung von 10^4 , einer Ausgangskonzentration von 5×10^8 und damit unserer gewollten Versuchskonzentration.

2.2.5. RNA-Isolierung

Zu Beginn musste das Medium aus der Zellkulturflasche (Cellstar Tissue Culture Flasks, 75 cm^2 , 250 ml, Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, Cat.658170) oder dem 6 Well Plate (Greiner Bio One GmbH ⁽¹⁰⁾, Art.Nr.657160) entfernt und dann der Zellrasen mit 10 ml PBS, welches danach wiederum abgesaugt wurde, gewaschen werden. Nach Vorlegen von 5 ml PBS wurden die Zellen mit einem Cell Scraper (Greiner Bio One

GmbH₍₁₀₎, Cat.541070) in die Lösung geschabt. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass vom Flaschenende zum Flaschenhals und nicht wieder zurück gearbeitet wird. Das so gewonnene Zell/PBS-Gemisch gaben wir nachfolgend in ein Testtube (Cellstar PP-Testtubes, Röhrchen 50 ml, Greiner Bio One GmbH₍₁₀₎, Cat.Nr.227261) und zentrifugierten es für 3 Minuten bei 1200 U/min. Danach wurde der Überstand abgesaugt.

Die folgenden Arbeitsschritte zur RNA-Isolierung wurden mit dem RNeasy Mini Kit (50)(Quiagen₍₂₅₎, Cat. 74104) der Firma Quiagen durchgeführt. Auf die Zellen wurde jetzt 600 µl RLT Buffer/ β-Mercaptoethanol (Merck₍₂₀₎, 50ml, ZA 1573506-541) gegeben. Mit einer Pipette sollte solange gemischt werden, bis eine homogene zähflüssige Lösung entsteht. Diese Lösung wurde nun auf die Shredder-Säule (QIAshredder (50), Quiagen, Cat. 79654) pipettiert und bei 14000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Den Einsatz des Shredders verwarfen wir versetzten das Gemisch danach mit 600 µl 70% Ethanol absolut (Riedel-de Haen₍₂₆₎, 32205). 700 µl dieser Probe gaben wir nun auf die RNase Mini Column und zentrifugierten diese bei 8000 U/min für 15 Sekunden. Die im Collection Tube befindliche Flüssigkeit musste entfernt werden. Die RNA befand sich vorerst im Einsatz der RNeasy Mini Column. Nach dem Zentrifugieren konnte die Flüssigkeit im Collection Tube deshalb vorerst immer verworfen werden.

Im Anschluss gaben wir den Rest des Ethanol-Gemisches auf die Säule und wiederholten den vorangegangenen Arbeitsschritt. Dann wurden 700 µl RW1 Buffer in die Säule pipettiert und wieder für 15 Sekunden bei 8000 U/min zentrifugiert. Im nächsten Schritt mischten wir 10 µl DNase und 70 µl RDD Buffer aus dem RNase Free DNase Set (50, Quiagen₍₂₅₎, Cat. 79254) und pipettierten das Gemisch auf die Säule. Nach einer Wirkzeit von 15 Minuten bei 20-30°C. wurde die Säule auf ein neues 2ml Collection Tube gesetzt, 500 µl RPE Buffer hinzupipettiert und nochmals für 15 Sekunden bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Der letzte Arbeitsgang musste wiederholt und das Gemisch für weitere 2 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert werden. Um alle Pufferreste zu entfernen, zentrifugierten wir ein weiteres Mal für 1 Minute auf einem neuen Collection Tube bei 14000 U/min. Der Säuleneinsatz wurde nachfolgend auf ein neues Cup (Sarstedt₍₂₈₎, 500 Reagiergefäße, 1,5ml, No./REF 72.690) gegeben und mit 25 µl RNase Free Water versehen. Um die RNA aus dem Einsatz zu waschen, zentrifugierten wir wiederum für 1 Minute bei 8000 U/min mit 25µl RNase Free Water. Dieses Procedere sollte man wiederholen. Bei zu

erwartender geringer RNA-Konzentration sollte nur mit 2x 25µl Wasser gewaschen werden. Sollten höhere Mengen an RNA zu erwarten sein, kann das Volumen an RNase Free Water erhöht werden. Die gewonnene RNA sollte bei -20°C gelagert werden.

2.2.6. cDNA-Synthese

Zu Beginn wurde die genaue RNA-Konzentration des Isolates im Photometer (Amersham Biosciences ⁽¹⁾, Pharmacia, GeneQuant, Art.Nr. 80-210198) bestimmt. Für den Einsatz des Photometers (Amersham Biosciences ⁽¹⁾, Pharmacia, GeneQuant, Art.Nr. 80-210198) wurde zunächst mit 80µl RNase Free Water (Quiagen ⁽²⁵⁾, RNeasy Mini Kit) in der 10mm³ Micro-Quarzküvette (Hellma ⁽¹²⁾, Art.Nr.105.202-QS) der Referenzstandard eingestellt. Danach pipettierten wir 8µl der gewonnenen RNA und 72µl RNase Free Water (Quiagen ⁽²⁵⁾, RNeasy Mini Kit) in die 10mm³ Micro-Quarzküvette der Firma Hellma ⁽¹²⁾ (Best.Nr. 105.202-QS) und maßen die Extinktion bei 260nm. Die genaue RNA Konzentration ergab sich aus dem Produkt der zuvor bestimmten Extinktion bei 260nm und dem Faktor 0,4. Aus der errechneten Konzentration konnte das Volumen errechnet werden, welches 2 µg RNA enthielt.

Für jede cDNA-Synthese setzten wir 1µg RNA und einen Kit der Firma MBI Fermentas (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (#K 1622)) ein.

Alle folgenden Arbeitsschritte außerhalb des Thermocyclers wurden auf Eis durchgeführt.

Das zuvor bestimmte Volumen mit 1 µg RNA wurde in ein Eppendorf Cup (Sarstedt ⁽²⁸⁾, 500 Reagiergefäße, 500µl, No./REF 72.690 oder Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, 500µl, farblos, Art.Nr.0030-121.023) gegeben und mit deionisiertem Wasser kombiniert. Das so vorläufig erhaltene Volumen aus RNA/Wasser betrug 11µl. Im nächsten Schritt wurde 1µl Random Hexamer Primer hinzugefügt und das Gemisch nach kurzem Durchmischen im Thermocycler (Landgraf Laborgeräte ⁽¹⁷⁾, Varius V) für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 4µl Reaction Buffer, 1µl RNase-Inhibitor und 2µl dNTP-Mix im anschließenden Schritt verblieb das Cup für 15 Minuten bei 25 °C im Thermocycler. Im letzten Arbeitsgang wurde das Cup nach Addition von 1µl M-MuL Reverse Transcriptase (200U/µl) 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Synthese erfolgte nun für 60 Minuten bei 42°C. Durch Aufheizen auf 70°C für 10 Minuten wird die Reaktion beendet. Die bei der Transkription gewonnene cDNA wird dann 1 zu 3125 mit

Wasser (Water, Molecular Biology Grade, 1l, Eppendorf (7), Order.No. 0032006.159) verdünnt, allequotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.7. Quantitative Real-Time-PCR

Die zuvor synthetisierte cDNA wurde in 5µl Volumina in die entsprechenden Wells pipettiert. Es empfiehlt sich erst ein Pipetierschema zu erstellen, um Irrtümern beim Pipettieren vorzubeugen bzw. die spätere Auswertung zu erleichtern.

Da die Probes lichtempfindlich reagieren wurde vorher, um das Pipettieren zu beschleunigen, ein Mastermix zusammengestellt. Dieser wurde in ein Eppendorf Cup (Eppendorf (7), Safe-Lock, farblos, Art.Nr.0030 120.094) gegeben und bestand aus folgenden Einzelkomponenten: 12,5µl TaqMan Universal Mastermix, 2,5µl Forward-Primer, 2,5µl Reverse-Primer, 1µl Probe und 1,5µl Wasser. Je nach benötigter Menge wurde ein Vielfaches der Einzelkomponenten pipettiert.

Der entstandene Mastermix wurde in Volumina zu 20µl auf die entsprechende cDNA gegeben.

Um gute Ergebnisse zu erhalten, nahmen wir am Thermocycler folgende Einstellungen vor. Initial wurde das Gemisch für 2 Minuten auf 50°C aufgeheizt. Dies war erforderlich, um eine optimale AmpErase UNG Enzym Aktivität zu gewährleisten. Danach wurde für 10 Minuten eine Temperatur von 95°C benötigt, um die AmpliTaq Gold Polymerase zu aktivieren. Die dann ablaufenden 40 Zyklen wechselten zwischen 15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei 60°C.

Bei der PCR wird ein definiertes Stück cDNA, das durch zwei Primer begrenzt ist, in immer wieder aufeinander folgenden Reaktionen in vitro vermehrt. Die Quantifizierung der synthetisierten PCR-Produkte in der quantitativen Real-Time-PCR erfolgt durch kontinuierliche Erfassung laserinduzierter Fluoreszenzsignale. Diese Signale werden von in der Reaktion enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffen emittiert. Die PCR-Produktmenge ist dabei direkt proportional zur Intensität des emittierten Fluoreszenzsignals. Es wird davon ausgegangen, dass mit dem Überschreiten des Fluoreszenzschwellenwertes, Threshold genannt, in jeder gemessenen Probe die gleiche Kopienzahl der zu analysierenden DNA-Sequenz enthalten ist. Als Ct-Wert, auch Threshold Cycle bezeichnet, wird der PCR-Zyklus spezifiziert, bei dem der Schwellenwert überschritten wird. Dies ist die Zykluszahl, bis zu der die linearen Verhältnisse des exponentiellen Wachstums gelten. Die TaqPolymerase synthetisiert im

idealisierten Fall den cDNA-Strang nach der Formel: Anzahl der cDNA-Stränge nach n Zyklen = 2^n .

Dieser wird von den zu untersuchenden Genen bestimmt.

In einem vorgeschalteten Lauf wurde mit definierten cDNA-Verdünnungsreihen in Schritten über mindestens 5 Zehnerpotenzen, die Konzentration bestimmt, in der sich die endogenen Kontrollen (18s bzw. GAPDH) und das zu bestimmende Gen linear zueinander verhalten. Dies war nötig, um zu gewähren, dass sich die eingesetzten Gene in verschiedenen Konzentrationen gleich verhalten. Es wurde dann für weitere Messungen wie zuvor beschrieben die Konzentration gewählt, welche gleiches Verhalten für die Genexpressionen erwarten ließ.

Die gewonnenen Daten wurden nun in einem eigens dafür generierten Programm mittels Microsoft Excel ausgewertet.

Der CT Wert eines Genes wurde nun von den sogenannten Houskeeping Genen (18s oder GAPDH) subtrahiert. Die erhaltenen Differenzen wurden nun nochmals von einem Normwert (gesunder Patient, nicht stimulierte Zelle) subtrahiert und das Ergebnis als Potenz zur Basis 2 gestellt. Die berechnete Zahl gab die Erhöhung bzw. Verringerung der Genexpression wieder.

2.2.8. Konventionelle PCR

Zu Beginn wurden alle Reagenzien zentrifugiert (Eppendorf ⁽⁷⁾, Centrifuge 5417R, Art.Nr.5407 000.317) und anschließend auf Eis gelagert. In ein 500µl Eppendorf Cup (Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, 500µl, farblos, Art.Nr.0030-121.023) wurden jetzt 5µl 10xPuffer+Mg²⁺, 1µl dNTP-Mix, je 0,5µl Reverse- und Forward-Primer, die 2,4µl TaqPolymerase und zuletzt 2µl cDNA pipettiert. Auf dieses Gemisch gaben wir nun noch 38,6 µl steriles destilliertes Wasser, um ein Endvolumen von 50µl zu erhalten. Der Inhalt des Eppendorf Cups wurde nochmals gemischt (Heidolph Instruments GmbH ⁽¹¹⁾, Reax 1DR) und zentrifugiert. Auf den fertigen Lösungsansatz der PCR wurde im nächsten Schritt noch 1 Tropfen Mineral Öl (Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾, Mineral Oil, Art.Nr.M5904) gegeben, um das Gemisch vor Verdunstung zu schützen. Im letzten Arbeitsgang wurde das Eppendorf Cup in den Thermocycler (Landgraf Laborgeräte ⁽¹⁷⁾, Varius V) gestellt und die PCR gestartet.

2.2.9. Gelelektrophorese

Die nachfolgende Methodik der Gelelektrophorese beschreibt die Arbeitsschritte zur Herstellung eines 3%igen Agarose-Gels. Alle anders konzentrierten Agarose-Gele wurden auf die gleiche Weise hergestellt bzw. es wurde bei der Gelelektrophorese gleichartig verfahren.

Zu Beginn wogen wir 1,5g Agarose für ein 3%iges Agarose-Gel mit der Waage (Mettler ⁽²¹⁾, Typ AE163) ab. Die 1,5g Agarose ergeben sich aus der Endmasse der Gellösung von 50ml bzw. 50g. Die Agarose wurde nachfolgend in 50ml TBE-Puffer in einem Erlenmyerkolben gelöst und in der Microwelle (Whirlpool ⁽³²⁾, VIP 20) bei 900 Watt für 2-3 Minuten belassen. In dieser Zeit bereiteten wir die Gelkammer vor. D.h. die offenen Seitenflächen wurden mit Tesaband (Tesa ⁽³¹⁾, Extra Power Gewebeband) verschlossen und der die Taschen bildende Kamm eingesetzt. Die Elektrophoresekammer (Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾, Typ SHU13) wurde jetzt mit TBE-Puffer (BioRad ⁽⁴⁾, 10x Tris/Boric Acid/EDTA (TBE), 1L, Art.Nr.161-0733) gefüllt, so dass später das gesamte Gel von TBE-Puffer bedeckt war. Für den folgenden Arbeitsgang sollten zum Schutz der Gesundheit Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Da Ethidiumbromid (Sigma - Aldrich ⁽²⁹⁾, 10ml, Art.Nr.E1510) hochgiftig ist, müssen Nitril-Handschuhe (Haddenham Healthcare, SafeEx, Art.Nr.371714) getragen werden. Die nun stark erhitzte Agarose/TBE-Puffer-Lösung wurde jetzt unter fließendem Wasser leicht abgekühlt, 1µl Ethidiumbromid hinzugefügt und unter leichtem Schwenken kurz durchmischt. Die Agarose/TBE-Puffer/Ethidiumbromid-Lösung gossen wir nun, ohne Blasen zu verursachen, vorsichtig in die Gelkammer. Nach ca. 60 Minuten war das Gel milchig geworden und damit einsatzbereit. Die Seitenteile (Tesaband) wurden, wie auch der Kamm, entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

Die cDNA musste vor dem Einsetzen in die Gelkammer noch mit einer Lösung (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, 6x Loading Dye, Art.Nr.R0611) gefärbt werden.

Dies war notwendig, um den Stand der Elektrophorese ohne UV-Licht beurteilen zu können. Dazu wurden 13µl cDNA und 2µl Farbstoff in ein Eppendorf Cup (Eppendorf ⁽⁷⁾, Safe-Lock, 500µl, farblos, Art.Nr.0030-121.023) gegeben, durchgemischt und in eine Tasche des Agarose-Gels pipettiert. In eine ausgewählte Tasche des Gels setzten wir nun den Referenzmarker (MBI Fermentas GmbH ⁽¹⁹⁾, GeneRuler, Art.Nr.SM0241) ein und nach Anschluss an die Stromquelle (BioRad ⁽⁴⁾, Modell 200/2.0 Power Supply) konnte die Elektrophorese gestartet werden.

Nach 1 bis 2 Stunden kontrollierten und dokumentierten wir anschließend das Ergebnis der Elektrophorese bzw. der PCR unter UV-Licht (MWG Biotech ⁽²²⁾), mit Kamera (Biophotonics Corp. ⁽⁵⁾, Gelprint 1000i) und Drucker (Sony Corp.). Anhand des Referenzmarkers und der bekannten Anzahl an Basenpaaren des PCR-Produktes, konnte jetzt eine Aussage über das Ergebnis der PCR getroffen werden.

2.2.10. Statistische Testverfahren

Alle Daten wurden nach der Erhebung auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Dafür wurden der Mittelwert, die Standardabweichung, der „error of the mean“ sowie die Konfidenzintervalle für alle erhaltenen Daten erhoben. Für die Gruppenvergleiche wurde der Student's T-Test für ungepaarte Stichproben verwendet. Die Signifikanz wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Als hochsignifikant galten p-Werte $< 0,01$, als signifikant p-Werte $< 0,05$ mit jeweils entsprechendem 95%-Konfidenzintervall. Alle gemessenen Daten bzw. erhobenen Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

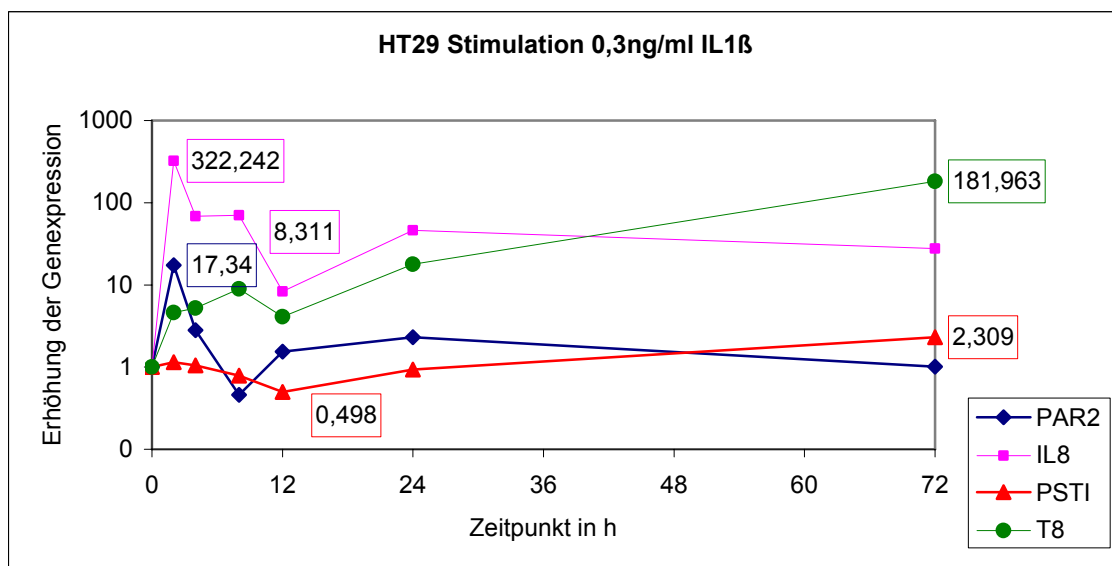
3.1. Stimulation HT29 und Caco2 mit Zytokinen

3.1.1. Stimulation HT29 mit Zytokinen und Lipopolysachariden (LPS)

Wie schon in der Einleitung (S. 11-12) erwähnt gibt es keine genauen Daten über das Expressionsverhalten von PAR2 während einer Entzündungsreaktion. Da bei den intestinalen Epithelzelllinien HT29 und Caco2 das Expressionsverhalten von Interleukinen sowie das Sekretionsmuster von Zytokinen in verschiedenen Entzündungsmodellen bekannt ist, haben wir diese intestinalen Zelllinien gewählt, um in verschiedenen Entzündungsmodellen durch Zugabe von Zytokinen und Lipopolysachariden die Expression von PAR2 zu untersuchen. Wir wollten das genaue Expressionsverhalten und seinen zeitlichen Verlauf aufzeigen. Die Stimulation von HT29 mit IL1 β , TNF α , IFN γ , LPS, Dexamethason und der Kombination von IL1 β /Dexamethason ergaben folgende Ergebnisse.

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Zytokinen und Lipopolysacchariden (LPS)

IL1 β führte zu einem raschen Anstieg der IL8 Expression auf das 322fache des Ausgangswertes nach 2 Stunden, um dann nach 12 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 8,3facher Expression abzufallen. Die PAR2 Expression erreichte genau wie IL8 das Maximum nach 2 Stunden mit 12facher Erhöhung, um nach 8 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 0,45 abzufallen. In der Folge bis 72 Stunden stieg die PAR-Expression wieder auf den Ausgangswert an. Die Expression von PSTI wurde durch IL1 β supprimiert und erreichte nach 12 Stunden mit 0,5fach ein Minimum. In der Folge stieg die Expression schwach auf das 2fache an. T8 zeigte nach der Stimulation mit IL1 β , ähnlich wie IL8 und PAR2, einen biphasischen Verlauf mit einem Maximum der Genexpression von 17fach nach 8 Stunden, um nach 12 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 4fach abzufallen. In der 2. Phase der Kurve zeigte T8 einen ausgeprägten Anstieg um nach 72 Stunden ein Maximum von 182facher Expression zu erreichen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

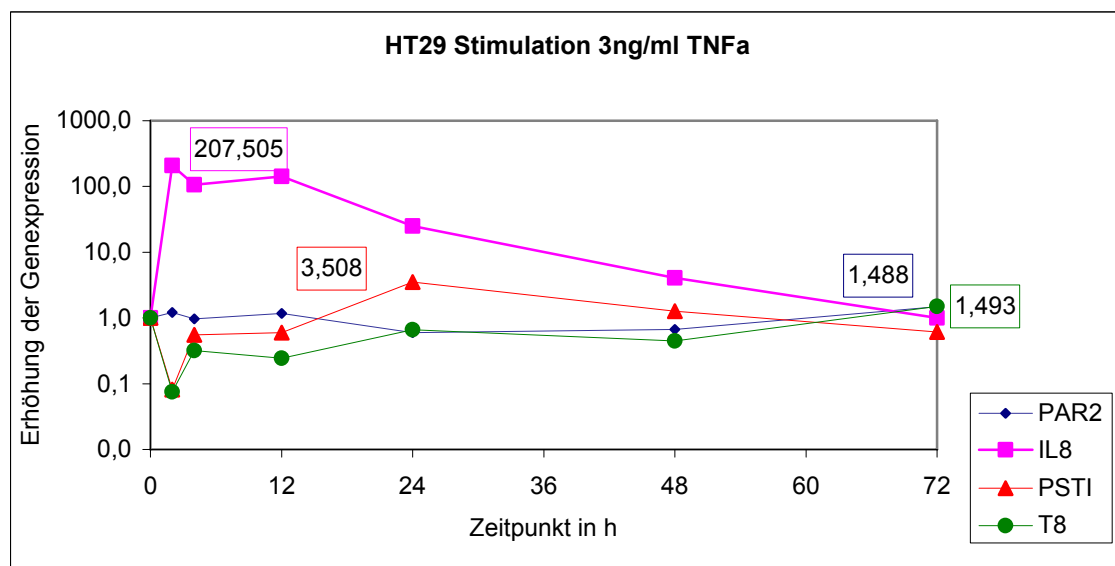
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 0,3ng/ml IL1 β

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5 μ l cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Zytokinen und Lipopolysachariden (LPS)

TNF α führte zu einem raschen Anstieg der IL8 Expression auf das 207fache des Ausgangswertes nach 2 Stunden, um dann nach 4 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 105facher Expression abzufallen. Nach 12 Stunden erreichte IL8 bei der biphasischen Expression ein weiteres Maximum mit 142facher Expression um nachfolgend innerhalb von 72 Stunden auf den Ausgangswert abzufallen. PAR2 zeigte in der Frühphase zunächst keine Regulation. In der Spätphase erfolgte dann ein schwacher Anstieg auf das 1,5fache. PSTI und T8 zeigten in der Frühphase bis 12 Stunden zunächst eine Gensuppression mit einem Minimum bei 2 Stunden mit 0,01facher bzw. 0,08facher Expression, um dann in der Spätphase wieder anzusteigen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

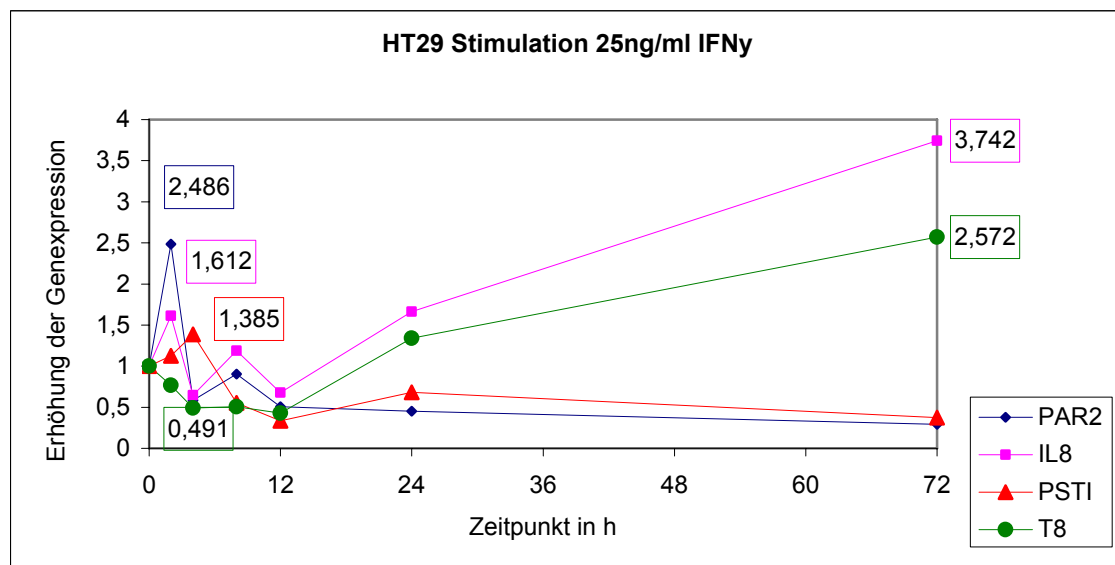
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 3ng/ml TNF α

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5 μ l cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Zytokinen und Lipopolysachariden (LPS)

INF γ führte bei IL8 zu einem mehrphasischen Verlauf mit einem zwischenzeitlichen Maximum von 1,5fach nach 2 Stunden und einem zwischenzeitlichen Minimum von 0,5fach nach 4 Stunden, um dann nach 8 Stunden wieder auf den Ausgangswert anzusteigen und nach 12 Stunden nochmals auf 0,5fach abzusinken. Nach 72 Stunden wurde dann das Maximum mit 3,7facher Expression erreicht. Im Gegensatz dazu zeigte PAR2 einen monophasischen Verlauf mit einem Maximum mit 2,5facher Steigerung der Expression nach 2 Stunden und einer nachfolgenden Suppression auf das 0,5fache des Ausgangswertes. PSTI zeigte einen biphasischen Verlauf mit einem initialen Maximum nach 8 Stunden mit 1,4facher Expression und nachfolgendem Abfall auf das 0,5fache. T8 zeigte einen gegenläufigen biphasischen Verlauf mit einer initialen Suppression mit einer minimalen 0,5fachen Expression nach 4 Stunden und einem anschließendem Anstieg mit einem Maximum von 2,6facher Expression nach 72 Stunden.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

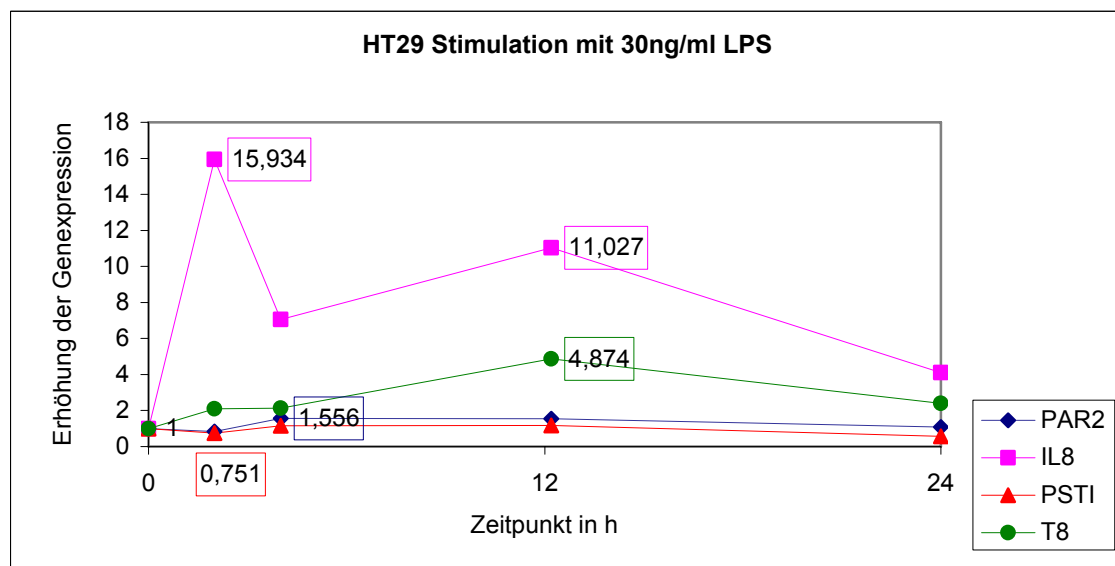
Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 25ng/ml IFN γ

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5 μ l cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Zytokinen und Lipopolysacchariden (LPS)

Bei der Stimulation mit LPS musste das Experiment nach 24 Stunden eingestellt werden, da nach 36 Stunden eine Zelllyse beobachtet wurde, die auch nach mehrmaliger Wiederholung immer wieder auftrat.

IL8 zeigte einen biphasischen Verlauf mit einem Maximum nach 2 Stunden mit 16facher Expression und einem zwischenzeitlichen Minimum mit 7facher Expression nach 8 Stunden, um nachfolgend erneut auf das 11fache anzusteigen und nach 24 Stunden nur noch 4fach exprimiert zu sein. PAR2 zeigte nach 4 Stunden ein Maximum von 1,6facher Erhöhung der Genexpression und fiel dann wieder auf den Ausgangswert ab. Bei PSTI kam es, innerhalb von 24 Stunden, zu keiner nennenswerten Regulation der Genexpression. T8 zeigte einen monophasischen Verlauf mit schwachem Anstieg innerhalb der ersten 4 Stunden, um nach 12 Stunden ein Maximum mit 4,9facher Expression zu erreichen und nachfolgend wieder abzufallen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

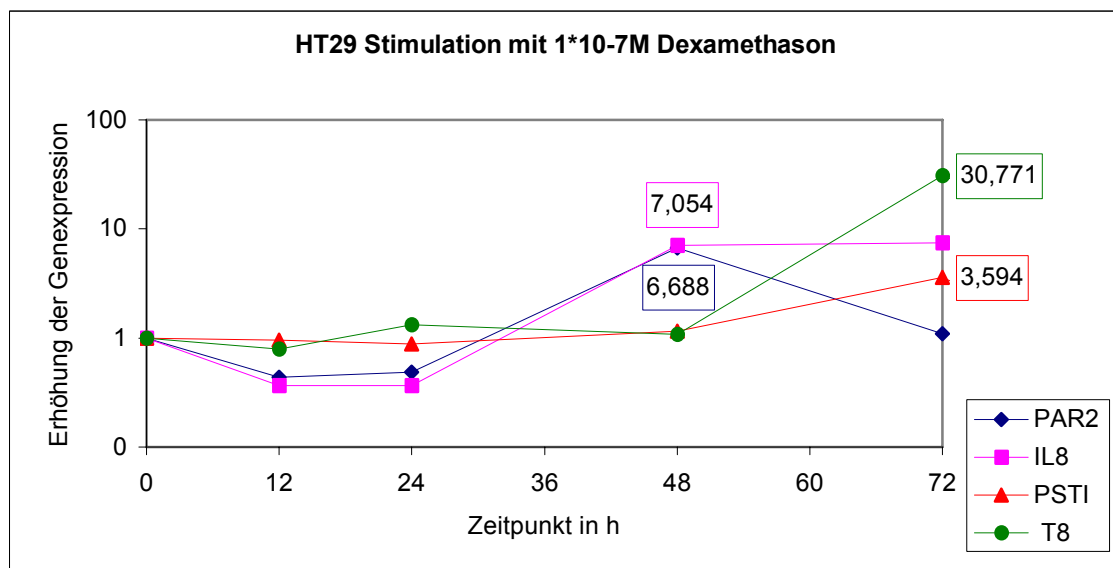
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 30ng/ml LPS

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Zytokinen und Lipopolysachariden (LPS)

HT29 mit Dexamethason zeigte bei IL8 einen biphasischen Verlauf mit initialer Suppression mit 0,5facher Expression innerhalb von 24 Stunden um dann nach 48 Stunden ein Maximum der IL8 Genexpression mit 7fachem Anstieg zu erreichen. PAR2 zeigte einen ähnlichen biphasischen Verlauf mit initialer Suppression und einem Maximum nach 48 Stunden mit 6facher Erhöhung. PSTI wurde monophasisch exprimiert und in den ersten 48 Stunden kaum reguliert, stieg jedoch nach 72 Stunden auf das 3,6fache an. Der Verlauf von T8 ist mit dem von PSTI vergleichbar und zeigte nach 72 Stunden ein Maximum mit 30facher Genexpression.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

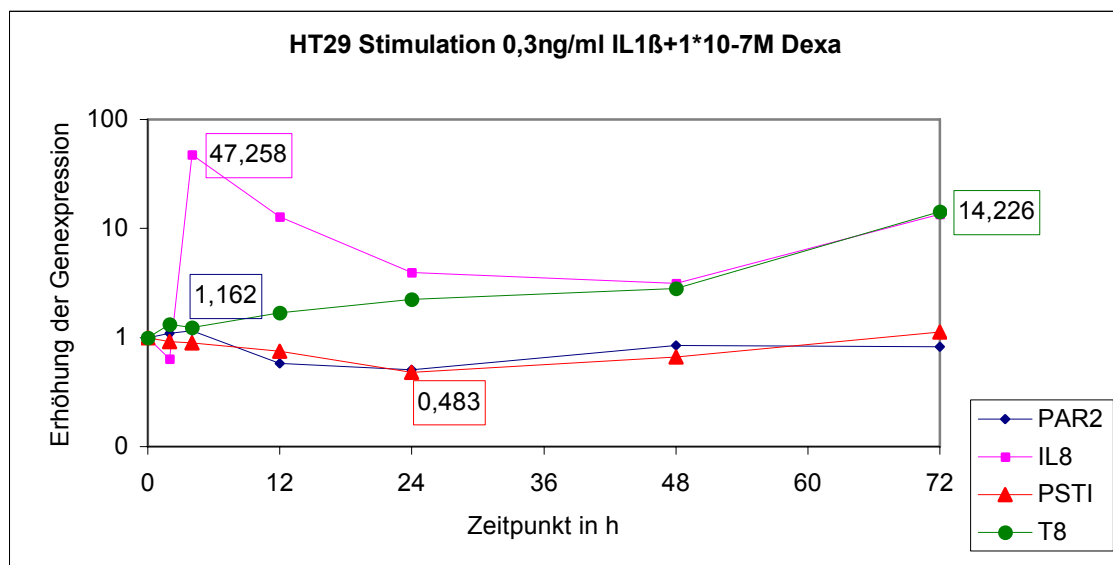
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 1×10^{-7} M Dexamethason

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Zytokinen und Lipopolysacchariden (LPS)

Die Stimulation mit IL1 β und Dexamethason führte initial zu einem geringfügigen Abfall nach 2 Stunden und nachfolgend nach 4 Stunden zu einem maximalen Anstieg der IL8 Genexpression auf das 47fache. Bei einem biphasischem Verlauf zeigte sich nach 72 Stunden ein erneuter Anstieg auf das 14fache. PAR2 zeigte nur einen geringen 1,2fachen Anstieg der Genexpression nach 4 Stunden, ansonsten keine auffällige Regulation. PSTI zeigte einen monophasischen Verlauf mit einer minimalen Suppression nach 24 Stunden mit dem 0,5fachen Genexpression und erreichte nach 72 Stunden wieder den Ausgangswert. T8 zeigte ebenfalls einen monophasischen Verlauf mit schwachem Anstieg innerhalb der ersten 48 Stunden, um nach 72 Stunden ein Maximum mit 14facher Expression zu erreichen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

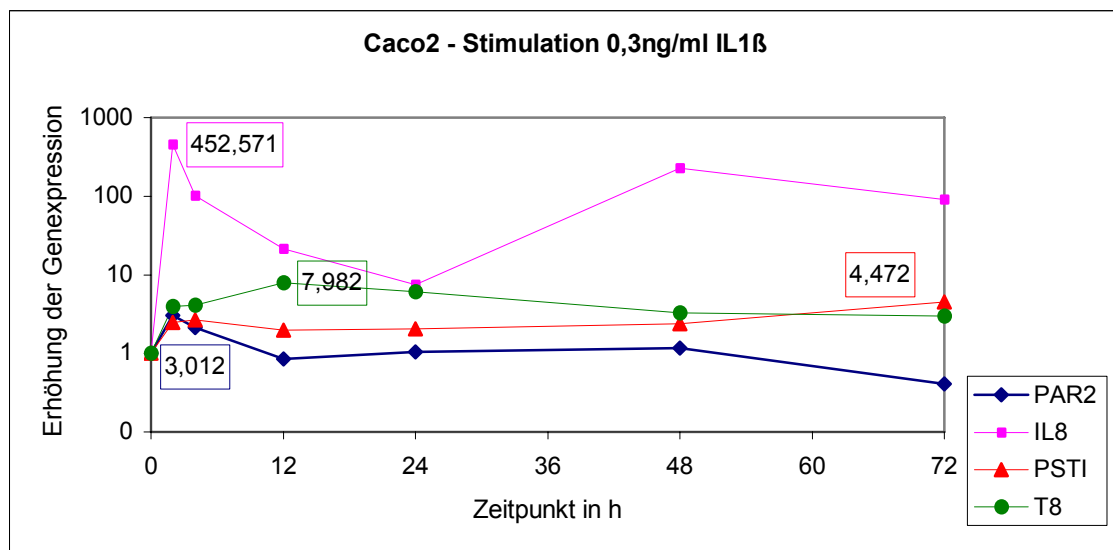
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 0,3ng/ml IL1 + 1x10⁻⁷ M
Dexamethason

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5 μ l cDNA

3.1.2. Stimulation Caco2 mit Zytokinen und Lipopolysachariden (LPS)

Caco2 reagierte auf die Stimulation mit IL1 β bei IL8 mit einem biphasischen Verlauf der Expression. Nach 2 Stunden zeigte sich nach einem raschen Anstieg ein Maximum der Genexpression von IL8 mit 452facher Expression. Nachfolgend fiel IL8 nach 24 Stunden auf das 7,5fache ab, um anschließend nach 48 Stunden wieder auf das 225fache anzusteigen und bei 72 Stunden immer noch 91fach exprimiert zu sein. PAR2 zeigte einen monophasischen Verlauf mit raschem Anstieg der Genexpression nach 2 Stunden auf das 3fache und einer Rückkehr auf den Ausgangswert innerhalb von 72 Stunden. PSTI stieg innerhalb der ersten 4 Stunden auf das 2,7fache an, um nach 72 Stunden auf ein Maximum mit 4,5facher Expression anzusteigen. T8 zeigte einen monophasischen Verlauf mit einem Maximum nach 12 Stunden mit 8facher Genexpression.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

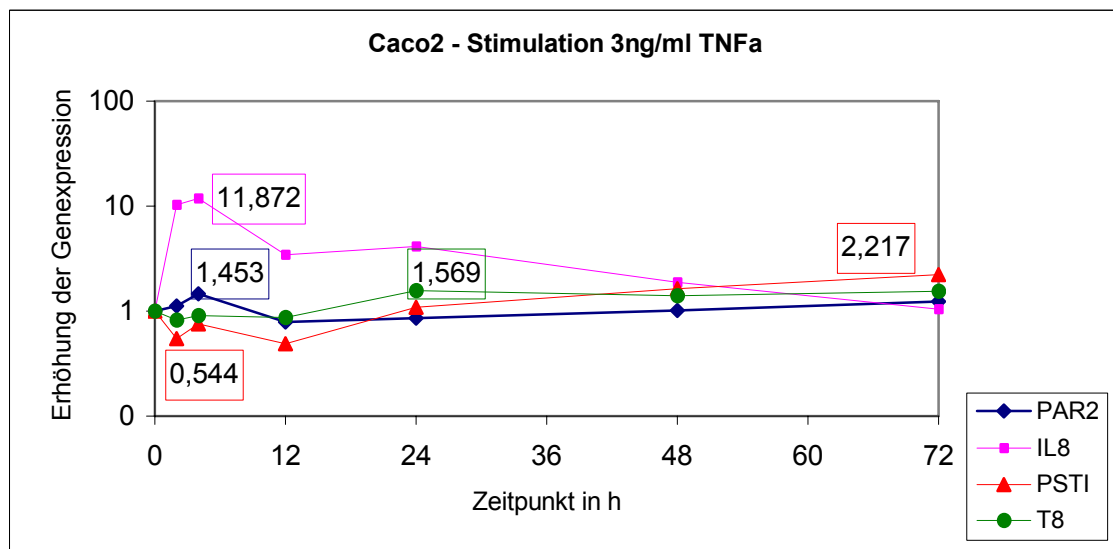
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 0,3 ng/ml IL1 β + 1×10^{-7} M
Dexamethason

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5 μ l cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Zytokinen und Lipopolysachariden (LPS)

TNF α führte zu einem monophasischen Anstieg der Genexpression von IL8 mit einer maximalen 12fachen Expression nach 4 Stunden. PAR2 erreichte bei einem monophasischen Verlauf nach 4 Stunden ein Maximum mit 1,4fachem Anstieg. PSTI zeigte nach initialer Supression auf das 0,5fache nach 72 Stunden einen Anstieg der Genexpression auf das 2fache des Ausgangswertes. T8 erreichte bei gleichem Verlauf nach 12 Stunden mit einer 1,6fachen Steigerung sein Maximum der Expression, die bis zu 72 Stunden bestehen blieb.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

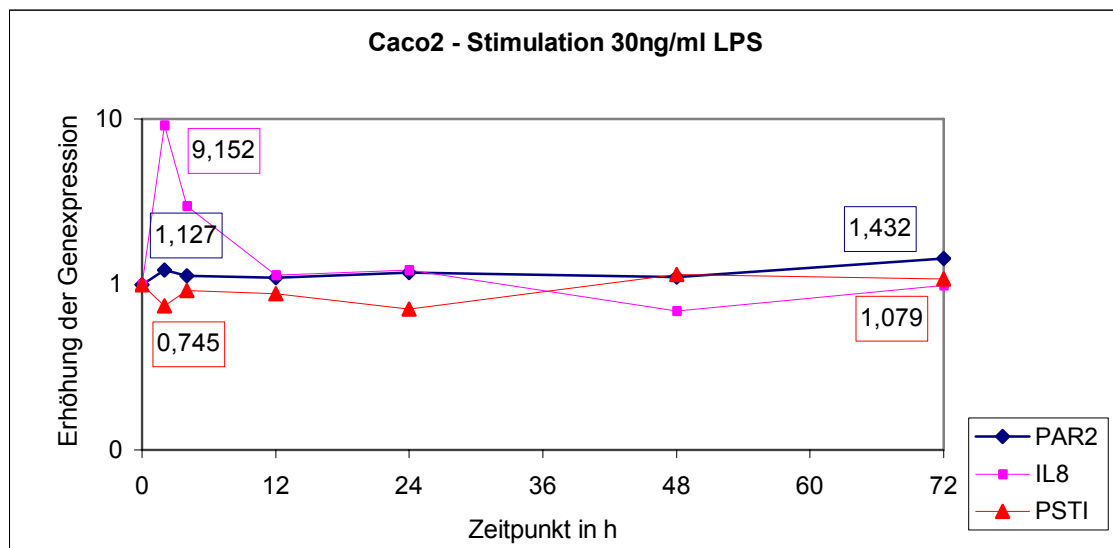
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 3ng/ml TNF α

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5 μ l cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Zytokinen und Lipopolysachariden (LPS)

Caco2 reagierten auf die Stimulation mit 30ng/ml LPS mit einer raschen monophasischen Steigerung der IL8 Expression nach 4 Stunden auf das 8fache, um nachfolgend schnell abzufallen und nach 72 Stunden wieder den Ausgangswert zu erreichen. PAR2 wurde innerhalb der ersten 48 Stunden kaum reguliert und erreichte nach 72 Stunden ein spätes Maximum mit 1,4fachem Anstieg der Genexpression. PSTI wurde zu Beginn supprimiert und blieb nachfolgend im Verlauf des Experimentes weitgehend unverändert.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

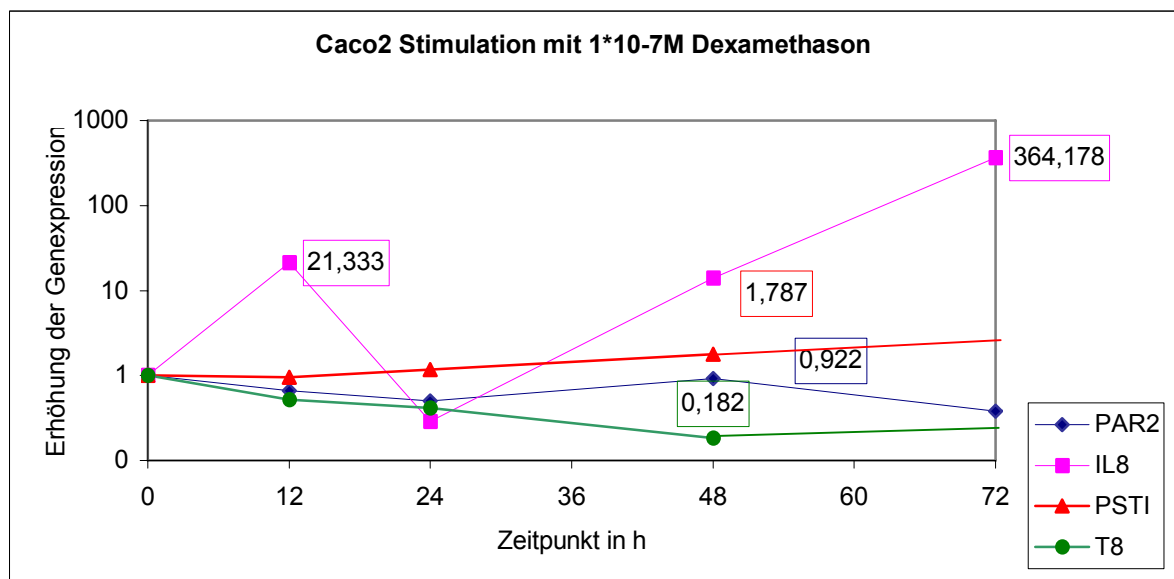
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 30ng/ml LPS

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Zytokinen und Lipopolysacchariden (LPS)

Die Stimulation von Caco2 mit Dexamethason führte zu einer biphasischen Regulation mit einem frühen 21fachen Anstieg von IL8 nach 4 Stunden, einem zwischenzeitlichen Minimum mit 0,3facher Suppression und einem nachfolgenden Anstieg nach 72 Stunden auf das 364fache. PAR2 wurde innerhalb der ersten 4 Stunden auf das 0,5fache supprimiert und erreichte innerhalb der folgenden Stunden nicht wieder das Ausgangsniveau. PSTI zeigte bei monophasischem Verlauf nach 48 Stunden eine 1,8fache Steigerung. T8 wurde über den gesamten Versuchszeitraum supprimiert und zeigte nach 48 Stunden ein Minimum mit 0,2facher Expression.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

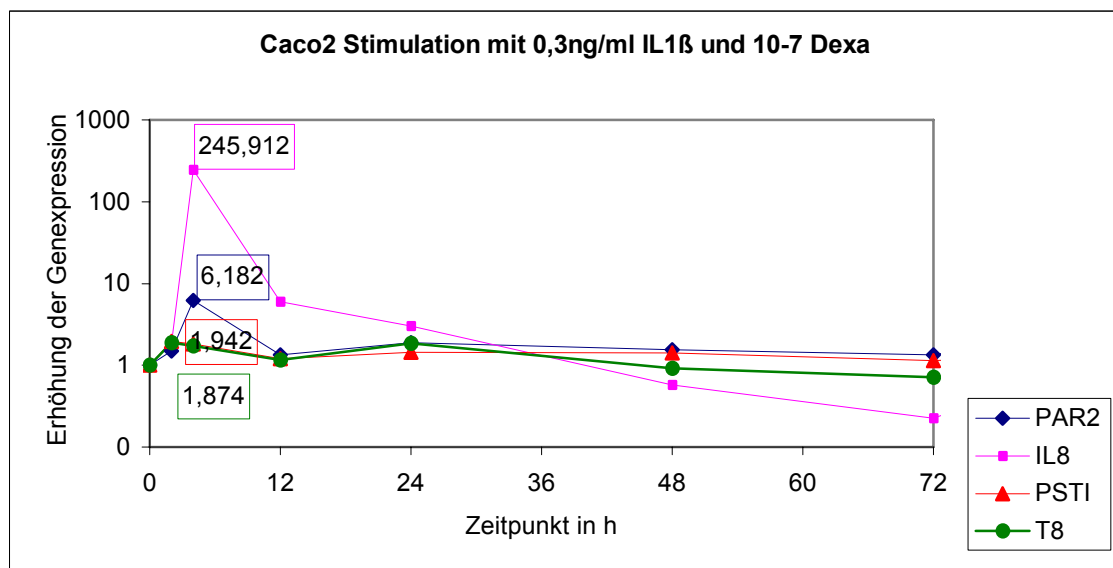
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit $1 \cdot 10^{-7}$ M Dexamethason

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Zytokinen und Lipopolysachariden (LPS)

Caco2 reagierte auf die Stimulation mit 0,3ng/ml IL1 β und 1*10⁻⁷ mg/ml Dexamethason mit einem monophasischen Verlauf der IL8 Expression und einem frühen Anstieg auf das 245fache nach 4 Stunden. PAR2 wurde ebenfalls monophasisch reguliert und erreichte ebenfalls nach 4 Stunden ein Maximum mit 6facher Steigerung. Beide zeigten gegen Ende der Messung nach 72 Stunden eine Annäherung an das Ausgangsniveau der Genexpression. PSTI und T8 zeigten einen ähnlichen monophasischen Verlauf mit frühem Anstieg nach 4 Stunden mit 2- bzw. 1,9facher Steigerung und gegen Ende des Experimentes eine Rückkehr zur Basisexpression.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 0,3 ng/ml IL1 β + 1x10⁻⁷ M
Dexamethason

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5 μ l cDNA

3.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse HT29 und Caco2 mit Zytokinen:

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse HT29 und Caco2 mit Zytokinen:

HT29

Zytokin \ Genexpression	IL8		PAR2		PSTI		T8	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät	früh	spät
IL1β	+++	+++	++	+	--	+	++	+++
TNFα	+++	++	0	0	--	+	--	+
INFγ	+	+	+	--	+	--	--	+
LPS	++	+	+	0	-	-	+	+
Dexamethason	--	+	--	+	0	+	0	++
IL1β/Dexamethason	++	+	-	0	-	0	+	++
früh = bis 12 Stunden spät = bis 72 Stunden				>100 = +++ (hoch) >10 = ++ (mittelwertig) >1,5 = + (gering) +/- = 0 <0,75 = - <0,5 = --				

IL8 zeigte bei HT29 den stärksten Anstieg in der Früh- wie auch in der Spätphase durch IL1 β (2h – 322fach, 24h – 46fach) und TNF α (2h – 207fach, 24h – 25fach) induziert. INF γ (2h – 1,6fach, 72h – 3,7fach) und LPS (2h – 15fach, 24h – 4fach) zeigten deutliche, wenn auch geringere Anstiege der IL8 Expression. Dexamethason führte zu einer Suppression der IL8 Expression in der Frühphase (12h – 0,4fach) und zu einer geringen Steigerung (48h – 7fach) der IL8 Expression in der Spätphase. In Verbindung von IL1 β und Dexamethason war in der Frühphase ein geringerer Effekt (4h – 47fach) der IL8 Expression zu verzeichnen als mit IL1 β allein (2h – 322fach).

PAR2 wurde, genau wie bei IL8, am deutlichsten durch IL1 β (2h – 17fach, 24h – 2,3fach) stimuliert. Geringere monophasische Anstiege der PAR2 Expression sind bei INF γ (2h – 2,5fach) und LPS (4h – 1,6fach) nachweisbar gewesen. Die Zugabe von TNF α zu HT29 zeigte keine signifikante Veränderung der PAR2 Expression, wohingegen die Expression von PAR2 deutlich durch Dexamethason (12h – 0,4fach) und geringer durch die Kombination von IL1 β und Dexamethason (12h – 0,6fach) in der Frühphase supprimiert wurde. In der Spätphase induzierte Dexamethason einen Anstieg der PAR2 Genexpression (48h – 6,7fach).

PSTI zeigte einen biphasischen Verlauf bei IL1 β und TNF α mit einer Suppression in der Frühphase (12h – 0,5fach) und eine geringe Steigerung der Expression in der Spätphase 72h – 2,3fach).

PSTI wurde ebenfalls biphasisch bei der Stimulation mit $\text{INF}\gamma$ exprimiert, wobei es zu einer geringen Steigerung in der Frühphase (4h – 1,4fach) und einer deutlichen Suppression in der Spätphase (72h – 0,5fach) kam. LPS bewirkte hingegen, bei zwischenzeitlicher Normalisierung, eine Suppression in der Früh- (2h – 0,75fach) und in der Spätphase (72h – 0,6fach). Dexamethason führte zu einer monophasischen Regulation von PSTI in der Spätphase (72h – 3,6fach) und die Kombination von $\text{IL1}\beta$ und Dexamethason zu einer frühen Suppression (12h – 0,5fach) ohne nennenswerte Regulation in der Spätphase.

Die T8 Expression wurde am deutlichsten durch $\text{IL1}\beta$ in der Früh- (8h – 17fach) und Spätphase (72h – 181fach) induziert. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{INF}\gamma$ bewirkten eine Suppression von T8 in der Frühphase (2h – 0,1fach) (4h – 0,5fach) und eine nachfolgende Steigerung der Expression in der Spätphase (72h – 1,5fach) (72h – 2,6fach). Die Expression von T8 zeigte nach Zusatz von LPS eine geringe Steigerung der Regulation über den gesamten Zeitverlauf mit einem Maximum in der Frühphase (12h – 4,9fach). Dexamethason und die Kombination von $\text{IL1}\beta$ und Dexamethason zeigten keine bzw. eine geringgradige Steigerung der T8 Expression in der Früh- und eine mittelgradige (72h – 31fach), (72h – 14fach) Steigerung der Expression in der Spätphase.

Caco2

Genexpression Zytokin	IL8		PAR2		PSTI		T8	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät	früh	spät
IL1β	+++	+++	+	0	+	+	+	+
TNFα	++	+	+	0	--	+	0	+
INFγ								
LPS	+	0	0	0	-	-		
Dexamethason	++	+++	0	0	0	+	-	--
IL1β/Dexamethason	+++	+	+	+	+	0	+	+
früh = bis 12 Stunden spät = bis 72 Stunden				>100 = +++ (hoch) >10 = ++ (mittelwertig) >1,5 = + (gering) +/- = 0 <0,75 = - <0,5 = --				

Genau wie bei HT29 wurde auch bei Caco2 durch IL1 β in der Früh- (2h – 452fach), wie auch in der Spätphase (48h – 225fach) die stärkste IL8 Induktion erreicht. TNF α führte in der Frühphase zu mittleren (4h – 12fach) in der Spätphase zu einer geringen Steigerung (24h – 4fach) der IL8 Expression. LPS induzierte in der Frühphase eine geringe (2h – 9fach) IL8 Expression und in der Spätphase keine signifikante Regulation. Dexamethason führte in der Frühphase zu einem mittleren (12h – 21fach), in der Spätphase zu einem hohen Anstieg (72h – 364fach) der IL8 Expression. Die Kombination von IL1 β und Dexamethason zeigte in der Frühphase eine hohe (4h – 245fach) und in der Spätphase eine geringe (24h – 3fach) Induktion der IL8 Expression, welche gegen Ende sogar in einer Suppression (72h – 0,4fach) mündete. PAR2 wurde bei Caco2 im Vergleich zu HT29 in der Frühphase nur gering durch IL1 β (2h – 2,7fach), TNF α (4h – 1,4fach) und die Kombination von IL1 β und Dexamethason (4h – 6fach) gesteigert. LPS und Dexamethason zeigten in der Frühphase keine signifikante PAR2 Regulation und PAR2 wurde in der Spätphase nur gering gesteigert (72h – 1,5fach) (48h – 1,7fach). In der Spätphase wurde PAR2 bis auf die Kombination von IL1 β und Dexamethason mit einer geringen Steigerung (72h – 1,3fach) der Genexpression von den anderen gemessenen Zytokinen nicht reguliert. PSTI wurde am deutlichsten durch IL1 β in der Frühphase (2h – 2,7fach) und durch die Kombination von IL1 β und Dexamethason (4h – 2fach) induziert. TNF α bewirkte eine starke Suppression (2h – 0,5fach) und LPS eine mittelwertige Suppression (2h – 0,75fach). PSTI wurde in der Spätphase gering durch IL1 β (48h – 2,3fach), TNF α (72h – 2fach) und Dexamethason (72h – 2,5fach) gesteigert exprimiert. T8 zeigte die stärkste Induktion in der Frühphase durch IL1 β (12h – 8fach) und durch die Kombination von IL1 β und Dexamethason (2h – 2fach) vermittelt. TNF α bewirkte in der Frühphase keine Veränderung und Dexamethason nur eine geringe Suppression (12h – 0,5fach) der T8 Genexpression. In der Spätphase induzierte IL1 β (72h – 3fach), TNF α (72h – 1,5fach) und die Kombination aus IL1 β und Dexamethason (24h – 1,8fach) eine geringgradige Steigerung und Dexamethason eine starke Suppression (48h – 0,2fach) der T8 Expression.

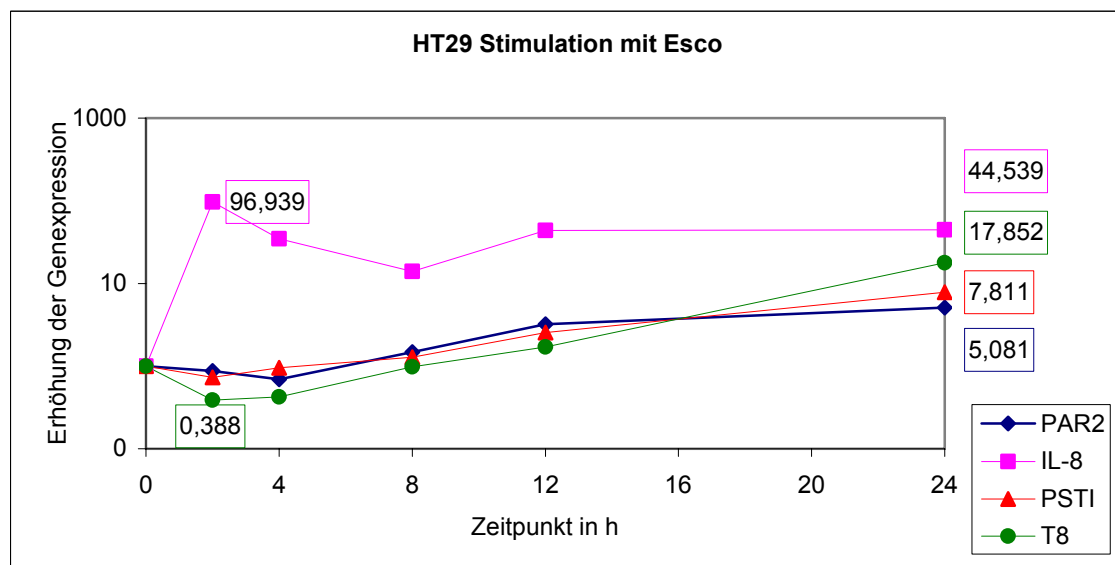
3.2. Stimulation HT29 und Caco2 mit Bakterien

3.2.1. Stimulation HT29 und Caco2 mit Bakterien – Versuchsaufbau 1

In diesem Versuchsaufbau wurde der Einfluss von *Enterococcus faecium* (Ecfc - ATCC 29212), *Escherichia coli* (Esco - ATCC 25922), *Yersinia enterocolitica* 08 (Yeen - MCCM 01839), *Salmonella typhi* (Saty - MCCM 01631) und *Listeria monocytogenes* (Limo - ATCC 19115, klinisches Isolat) auf die Expression von IL8, PAR2, PSTI und T8 bestimmt.

3.2.1.1. Stimulation HT29 mit Bakterien – Versuchsaufbau 1

Escherichia coli bewirkte eine biphasische Induktion von IL8 mit 96fachem Anstieg nach 2 Stunden. Nach kurzem Abfall nach 8 Stunden erfolgte innerhalb von 24 Stunden ein erneuter Anstieg auf das 45fache. Die Expression von PAR2 wurde biphasisch reguliert und führte nach 2 Stunden zu einer initialen Suppression auf 0,8fach, um nachfolgend innerhalb von 24 Stunden wieder auf das 5fache anzusteigen. Ebenso verliefen die Regulationen von PSTI und T8 mit einer initialen Suppression nach 2 Stunden und einer nachfolgenden Steigerung auf das 8- bzw. 18fache nach 24 Stunden.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

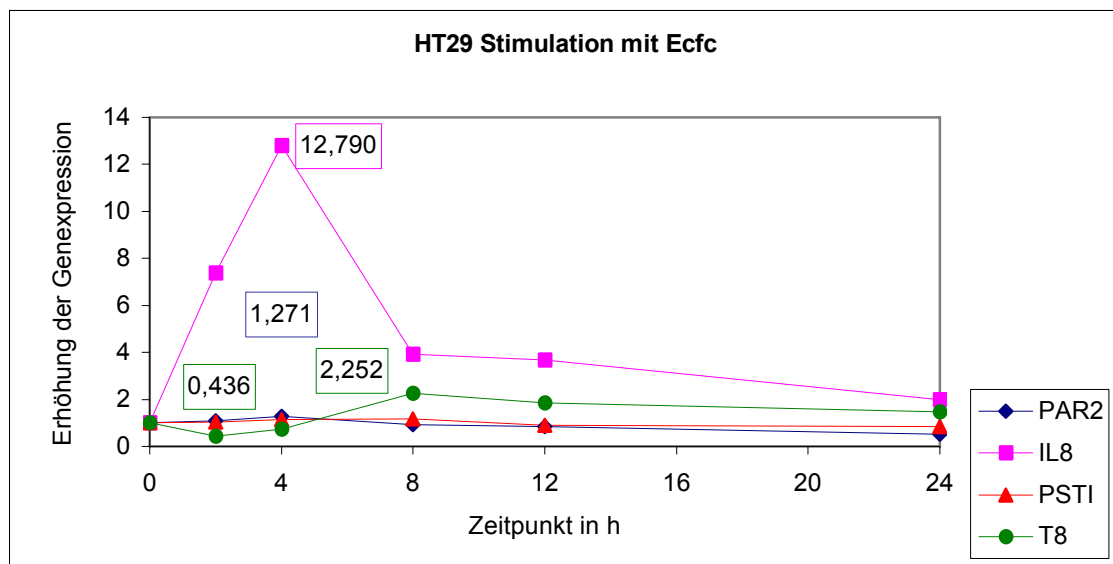
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n:=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien/ Well einer
6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 1

HT29 zeigten nach Stimulation mit *Escherichia coli* (Ecfc) eine monophasische Regulation von IL8 mit dem Maximum des 13fachen der Grundexpression nach 4 Stunden. Im Verlauf fiel die Expression von IL8 wieder auf den Grundwert ab. PAR2 und PSTI zeigten im Verlauf nur minimale Veränderungen der Genexpression. Die Expression von T8 wurde biphasisch reguliert und zeigte nach 2 Stunden eine Suppression auf die Hälfte des Ausgangswertes und nach 8 Stunden eine Steigerung mit einem Maximum von 2.



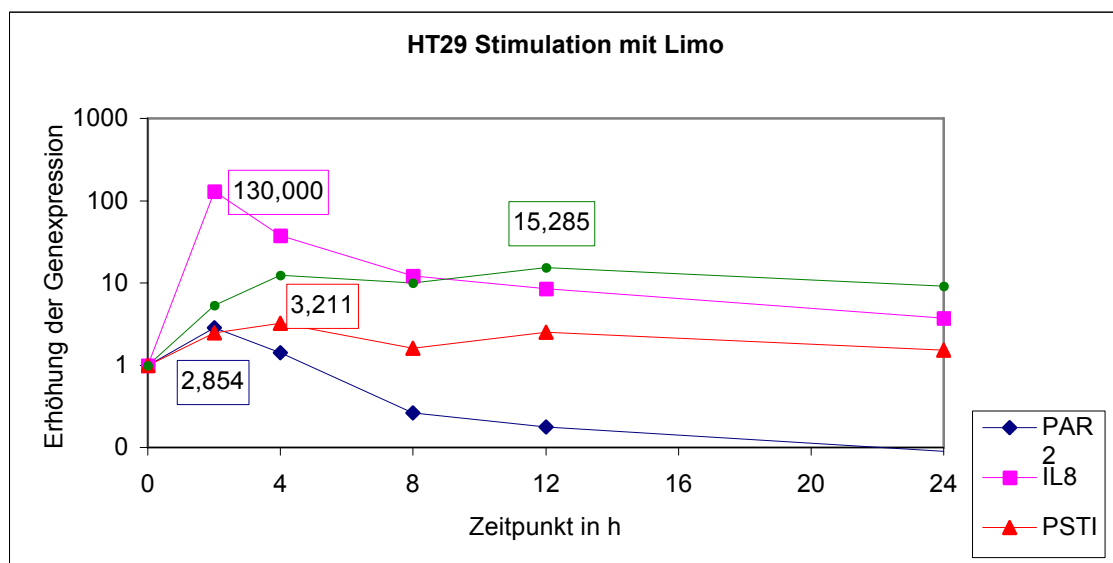
Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien/ Well einer
6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

HT29 zeigten nach Stimulation mit *Listeria monocytogenes* eine monophasische Regulation der IL8 Expression mit einem raschen Anstieg auf das 130fache nach 2 Stunden, um nachfolgend innerhalb von 24 Stunden wieder abzufallen. PAR2 wurde ebenfalls monophasisch reguliert und erreichte nach 2 Stunden ein Maximum mit 2,8facher Steigerung der Genexpression, um danach stark supprimiert unter den Ausgangswert auf 0,1 abzusinken. PSTI wurde biphasisch exprimiert und zeigte nach 4 Stunden mit einem initialen Maximum mit 3facher Erhöhung nach 12 Stunden eine weitere Steigerung der Genexpression mit 2,5fachem Anstieg. T8 wurde monophasisch exprimiert und zeigte nach 12 Stunden einen 15fachen Anstieg der Genexpression, um dann wieder gering auf das 10fache der Grundexpression abzufallen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

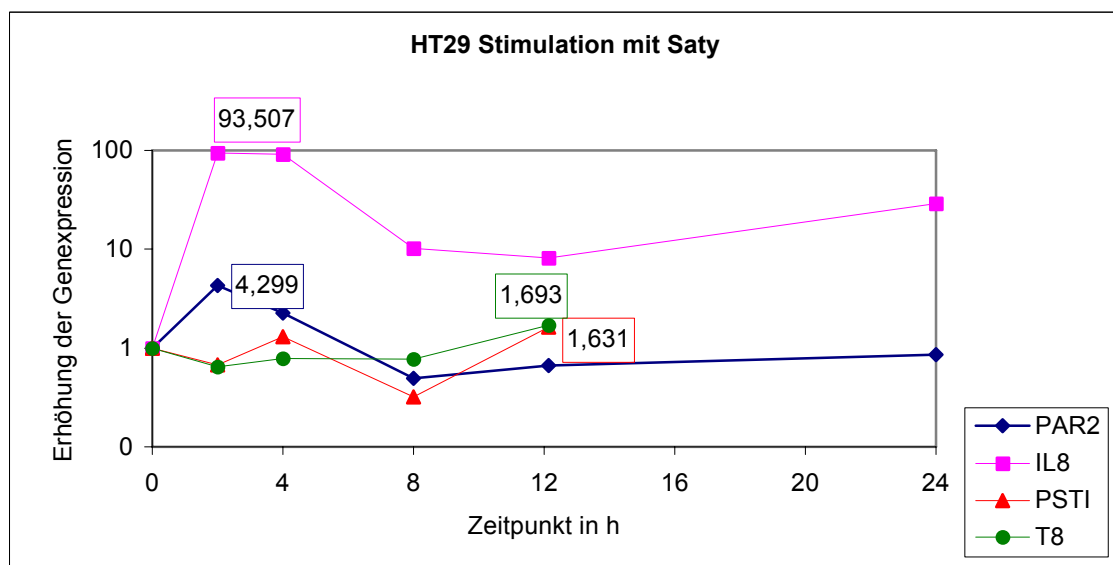
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien/ Well einer
6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 1

HT29 zeigten nach Stimulation mit *Salmonella typhi* eine biphasische Regulation der IL8 Expression mit einem initialen Anstieg auf das 93fache nach 2 Stunden und einer weiteren Steigerung der Genexpression nach 24 Stunden auf das 30fache. PAR2 wurde monophasisch reguliert und zeigte nach 2 Stunden ein Maximum mit 4,3fachem Anstieg der Genexpression, um zwischenzeitlich gering supprimiert zu werden und nach 24 Stunden wieder auf den Ausgangswert anzusteigen. PSTI zeigte einen undulierenden Verlauf mit einem initial geringfügigen Anstieg, nach 8 Stunden einer Suppression auf das 0,3fache, um nach 12 Stunden mit dem 1,6fachen der Grundexpression den höchsten Anstieg zu erreichen. T8 wurde monophasisch reguliert und zeigte nach 12 Stunden eine 1,7fache Steigerung der Genexpression.



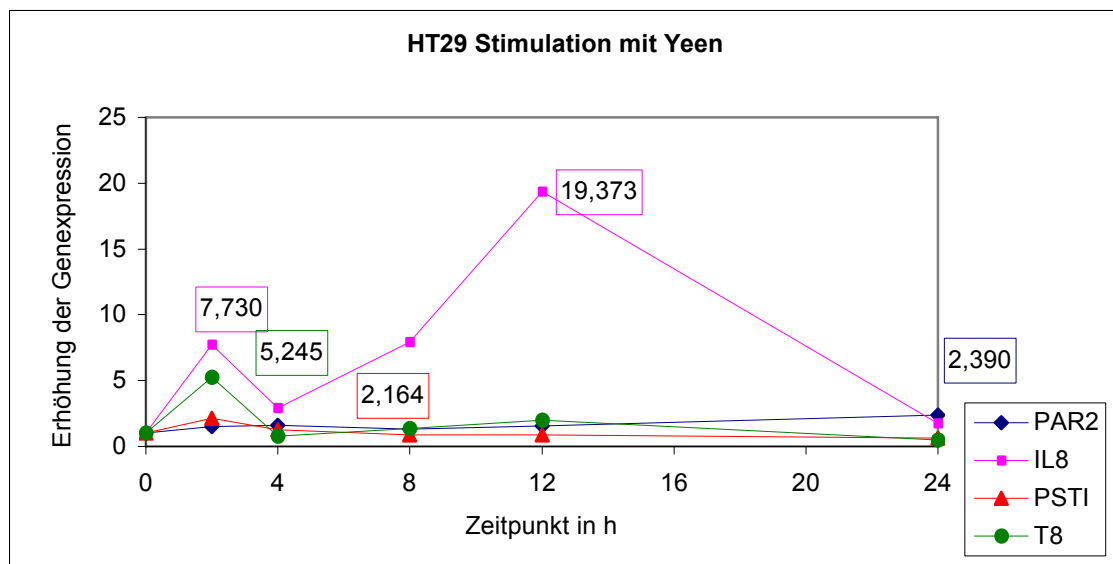
Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien/ Well einer
6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

HT29 zeigten nach Stimulation mit *Yersinia enterocolitica* eine biphasische Regulation von IL8 mit einem initialen Anstieg nach 2 Stunden auf das 8fache, einem zwischenzeitlichen Abfall auf das 2,5fache der Grundexpression und einem späteren Anstieg nach 12 Stunden mit 19facher Erhöhung der Genexpression. PAR2 wurde monophasisch reguliert und zeigte nach 24 Stunden ein Maximum mit 2,4facher Steigerung der Genexpression. PSTI und T8 wurden ebenfalls monophasisch reguliert und zeigten beide ein Maximum nach 2 Stunden mit 2,1- bzw. 5facher Erhöhung der Expression, um danach wieder auf den Wert der Grundexpression zu sinken.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

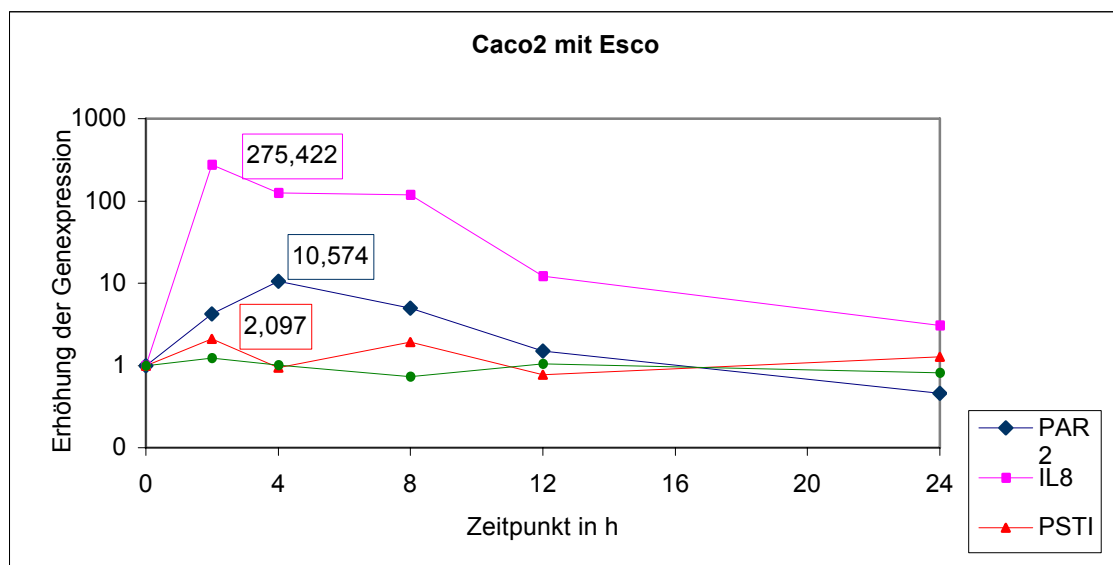
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien/ Well einer
6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

3.2.1.2. Stimulation Caco2 mit Bakterien – Versuchsaufbau 1

Caco2 zeigten nach Stimulation mit Escherichia coli bei IL8 eine monophasische Regulation mit einem schnellen 275fachen Anstieg nach 2 Stunden, um sich dann langsam über den Verlauf von 24 Stunden wieder der Grundexpression anzunähern. PAR2 wurde ebenfalls monophasisch exprimiert und erreichte nach 4 Stunden mit 10facher Steigerung das Maximum der Genexpression, um nachfolgend nach 24 Stunden gering supprimiert abzufallen. PSTI wurde biphasisch reguliert und zeigte nach 2 Stunden einen ersten Anstieg auf das 2fache, um zwischenzeitlich kurz auf den Wert der Grundexpression abzufallen und nach 8 Stunden erneut auf das 2fach der Grundexpression anzusteigen. T8 wurde im Verlauf des Experimentes nur gering und nicht signifikant reguliert.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

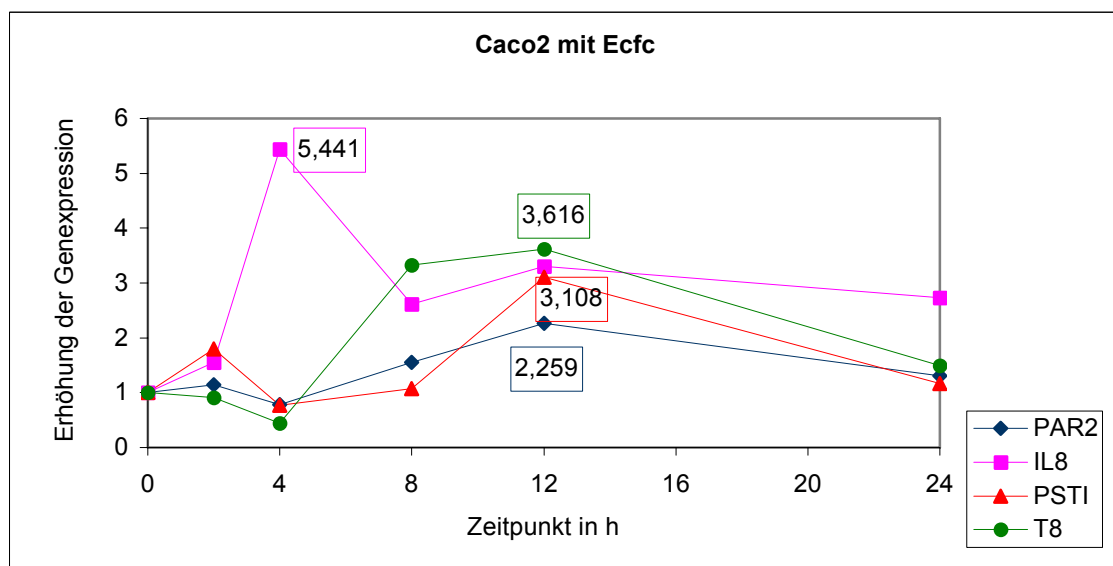
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien / Well einer 6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 1

Caco2 zeigte nach Stimulation mit *Enterococcus faecium* bei IL8 eine biphasische Regulation mit einem initialen Maximum nach 4 Stunden mit 5fachem Anstieg der Genexpression, einem zwischenzeitlichen Abfall auf das 2,6fache, um dann nach 12 Stunden wieder auf das 3fache der Grundexpression anzusteigen. PAR2 wurde ebenfalls biphasisch reguliert und zeigte nach 2 Stunden einen geringen Anstieg der Genexpression auf das 1,2fache gefolgt von einer Suppression nach 4 Stunden auf das 0,7fache und einem Anstieg der Genexpression nach 12 Stunden auf das 2,2fache. PSTI wurde, wie PAR2, biphasisch reguliert und zeigte nach 2 Stunden einen initialen Anstieg auf das 1,8fache der Grundexpression. Nach 4 Stunden folgte eine Suppression der PSTI Expression auf das 0,7fache gefolgt von einem weiteren Anstieg nach 12 Stunden auf das 3,1fache. T8 wurde ebenfalls biphasisch reguliert. Nach anfänglicher Suppression nach 4 Stunden auf das 0,4fache stieg T8 nach 12 Stunden auf das 3,6fache der Grundexpression an, um nachfolgend wieder auf den Ausgangswert abzufallen.



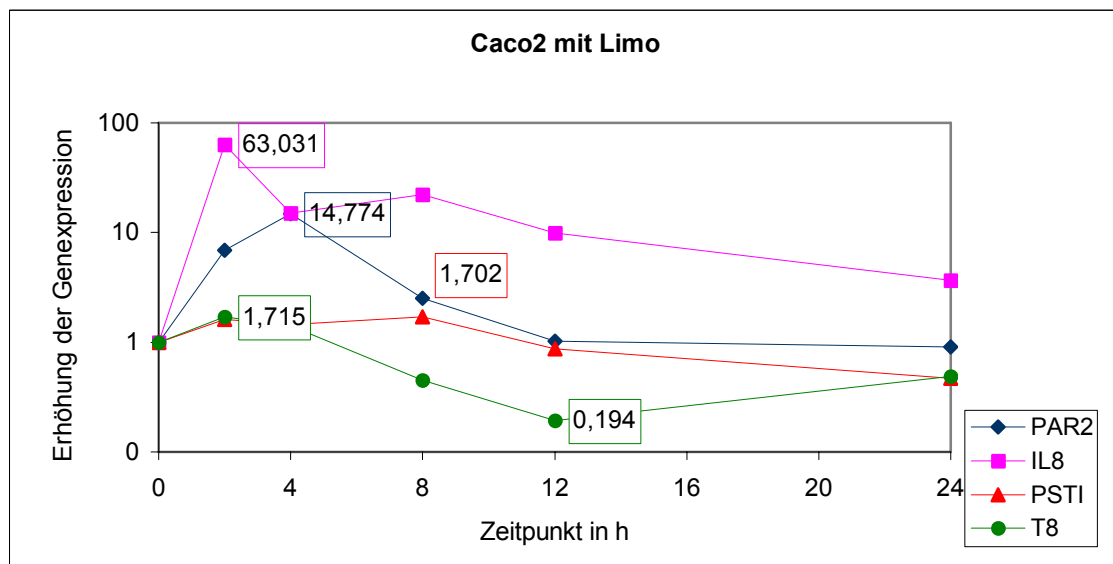
Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien/ Well einer 6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Caco2 reagierten auf *Listeria monocytogenes* mit einer biphasischen Regulation der IL8 Expression, wobei es nach 2 Stunden zu einem raschen Anstieg auf das 63fache und nach 4 Stunden zu einem zwischenzeitlichen Abfall auf das 14fache kam, um nach 8 Stunden erneut auf das 22fache des Ausgangswertes anzusteigen. PAR2 wurde monophasisch reguliert und erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 15facher Steigerung der Genexpression, um nachfolgend wieder auf Werte der Grundexpression abzufallen. PSTI wurde biphasisch reguliert und stieg initial langsam an, um nach 8 Stunden ein Maximum von 1,7facher Genexpression zu erreichen. Nach 24 Stunden zeigte PSTI dann eine Suppression von 0,5facher Grundexpression. T8 wurde ebenfalls biphasisch reguliert und zeigte nach 2 Stunden einen initialen Anstieg auf das 1,7fache. Nach einer zwischenzeitlichen Suppression nach 12 Stunden auf das 0,2fache stieg die Genexpression nach 24 Stunden wieder auf 0,5 an.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

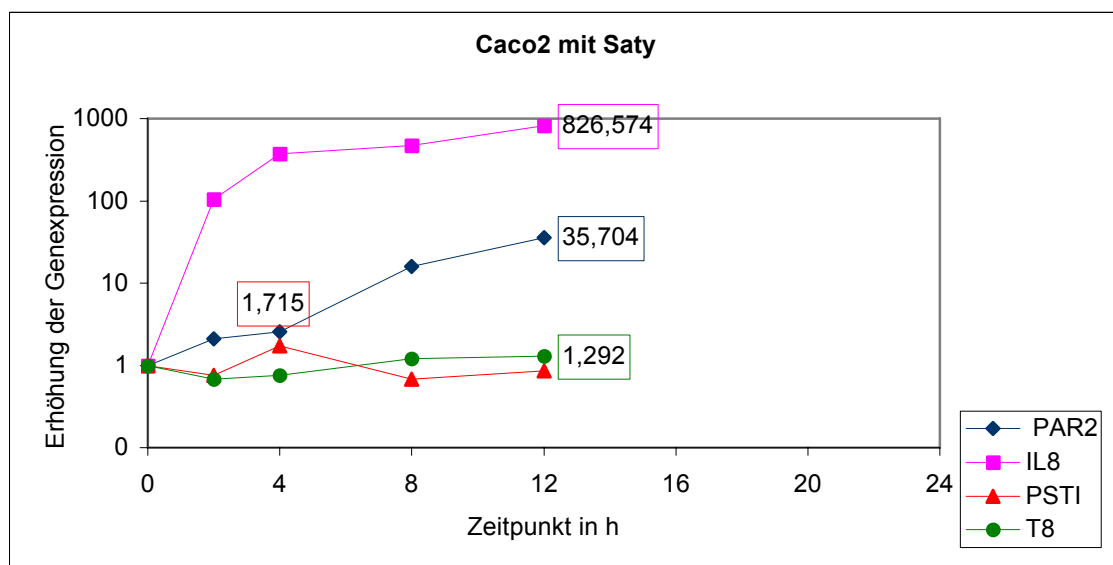
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien / Well einer 6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 1

Nachdem Caco2 mit *Salmonella typhi* versetzt wurden, kam es nach 12 - 16 Stunden zu einer infektionsbedingten Zelllyse. Im gemessenen Zeitraum wurde IL8 monophasisch reguliert. IL8 zeigte innerhalb von 12 Stunden einen Anstieg der IL8 Expression auf das 827fache. PAR2 wurde ebenfalls monophasisch reguliert und stieg innerhalb von 12 Stunden auf das 36fache der basalen Expression an. PSTI zeigte eine initiale Suppression nach 4 Stunden und nachfolgend eine Steigerung der Genexpression auf das 1,7 fache. Im Verlauf der Stimulation ließen sich für T8 keine nennenswerten Veränderungen aufzeigen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

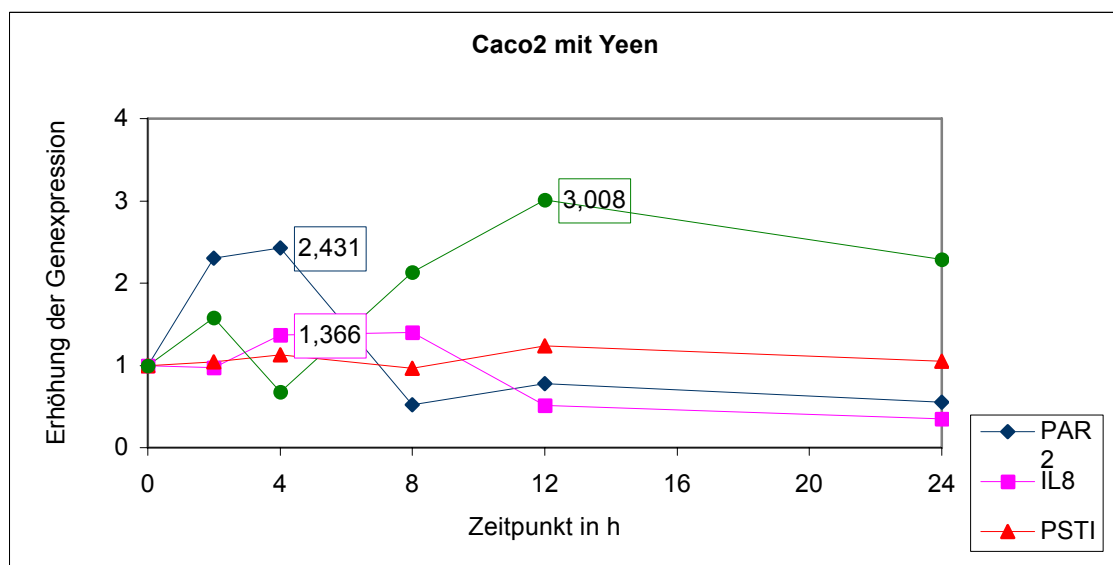
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
5x10⁸ Bakterien / Well einer 6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 1

Caco2 zeigten nach der Stimulation mit *Yersinia enterocolitica* eine biphasische Regulation von IL8 mit einem Anstieg der IL8 Expression nach 4 Stunden auf das 1,4fache und einer nachfolgenden Suppression innerhalb von 24 Stunden auf das 0,3fache der Grundexpression. PAR2 wurde ebenfalls biphasisch reguliert, zeigte nach 4 Stunden eine maximale Steigerung auf das 2,4fache und wurde danach auf das 0,5 fache supprimiert. Die Expression PSTI wurde im Laufe des Versuches kaum reguliert. T8 wurde ebenfalls, wie auch IL8 und PAR2, biphasisch exprimiert. Nach einem initialen Anstieg auf das 1,6fache und einer zwischenzeitlichen Suppression auf das 0,6fache erreichte T8 nach 12 Stunden ein Maximum mit 3facher Steigerung der Genexpression.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen
Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
5x10⁸ Bakterien / Well einer 6-Well Platte
Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

3.2.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse - HT29 und Caco2 mit Bakterien I

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse HT29 und Caco2 mit Bakterien I:

HT29

Genexpression Bakterium	IL8		PAR2		PSTI		T8	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät	früh	spät
Escherichia coli	++	++	0	+	-	+	--	++
Enterococcus faecium	+	+	0	-	0	-	--	+
Listeria monocytogenes	+++	++	+	--	+	+	++	++
Salmonella typhi	++	++	+	0	--	+	--	+
Yersinia enterocolitica	+	++	+	+	+	--	+	--
früh = bis 12 Stunden spät = bis 72 Stunden				>100 = +++ (hoch) >10 = ++ (mittelwertig) >1,5 = + (gering) +/- = 0 <0,75 = - <0,5 = --				

Caco2

Genexpression Bakterium	IL8		PAR2		PSTI		T8	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät	früh	spät
Escherichia coli	+++	+	++	--	+	0	0	0
Enterococcus faecium	+	+	+	0	+	0	+	0
Listeria monocytogenes	++	+	++	0	+	--	+	--
Salmonella typhi	+++		++		+		0	
Yersinia enterocolitica	0	--	+	-	0	0	+	+
früh = bis 12 Stunden spät = bis 72 Stunden				>100 = +++ (hoch) >10 = ++ (mittelwertig) >1,5 = + (gering) +/- = 0 <0,75 = - <0,5 = --				

Während *Enterococcus faecium* bei beiden Zelllinien keine wesentliche Induktion der untersuchten Gene zeigte, führte die Besiedlung mit einem apathogenen *Escherichia coli* Stamm (ATCC25922) zu einer raschen und ausgeprägten IL8 Induktion (HT29: 2h - 96fach; Caco2: 2h - 275fach) sowie einer deutlichen jedoch etwas verzögerten PAR2 Induktion (HT29: 24h - 5fach; Caco2: 4h - 10fach). PSTI zeigte nur bei Caco2 eine geringe Steigerung der Genexpression in der Frühphase (2h - 4fach) und wurde bei HT29 nicht signifikant reguliert. T8 war bei HT29 in der Frühphase supprimiert (2h - 0,4fach) und in der Spätphase gesteigert exprimiert (24h - 8fach). T8 wurde bei Caco2 nicht reguliert.

Die Zelllinie Caco2, welche im Gegensatz zur Zelllinie HT29 eine hochdifferenzierte Zelllinie ist, reagierte „empfindlicher“ auf die bakterielle Besiedlung als Zellen der Zelllinie HT29. Dies wurde einerseits am frühen Zelltod der Zelllinie Caco2 12 Stunden nach der Infektion mit *Salmonella typhi* (invasiv, gram neg.), aber auch durch das Ausmaß einer höheren absoluten und relativen Expression von PAR2 und IL8, deutlich. Bei HT29 wurde das Maximum der IL8 Expression in der Frühphase erreicht (2h - 93fach). In der Spätphase kam es zu einer weiteren Steigerung (24h - 30fach). Caco2 hingegen zeigten in der Frühphase eine spätere jedoch höhere Induktion der IL8 Genexpression (12h - 826fach). PAR2 wurde bei HT29 in der Frühphase (2h - 4fach) reguliert, während PAR2 bei Caco2 erst in der späten Frühphase (12h - 35fach) maximal exprimiert wurde. PSTI und T8 wurden bei beiden Zelllinien nach Zugabe von *Salmonella typhi* ähnlich exprimiert (12h - 1,3-1,6fach).

Listeria monocytogenes (invasiv, gram pos.) führte zu einer raschen und ausgeprägten Induktion von IL8 (HT29: 2h - 130fach; Caco2: 2h - 63fach) und PAR2 (HT29: 2h - 3fach; Caco2: 4h - 14fach). PSTI (4h - 3fach) und T8 (4h - 12fach) wurden bei HT29 ähnlich exprimiert und zeigten ihre Maxima in der Frühphase. Bei Caco2 wurde PSTI in der Frühphase zunächst gesteigert (8h - 1,7fach), um in der Spätphase supprimiert zu sein (24h - 0,5fach). T8 zeigte dabei einen ähnlichen Verlauf wie PSTI mit einem Anstieg in der Frühphase (2h - 1,7fach) und einer Suppression in der Spätphase (12h - 0,2fach).

Ergebnisse - Zusammenfassung HT29 und Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 1

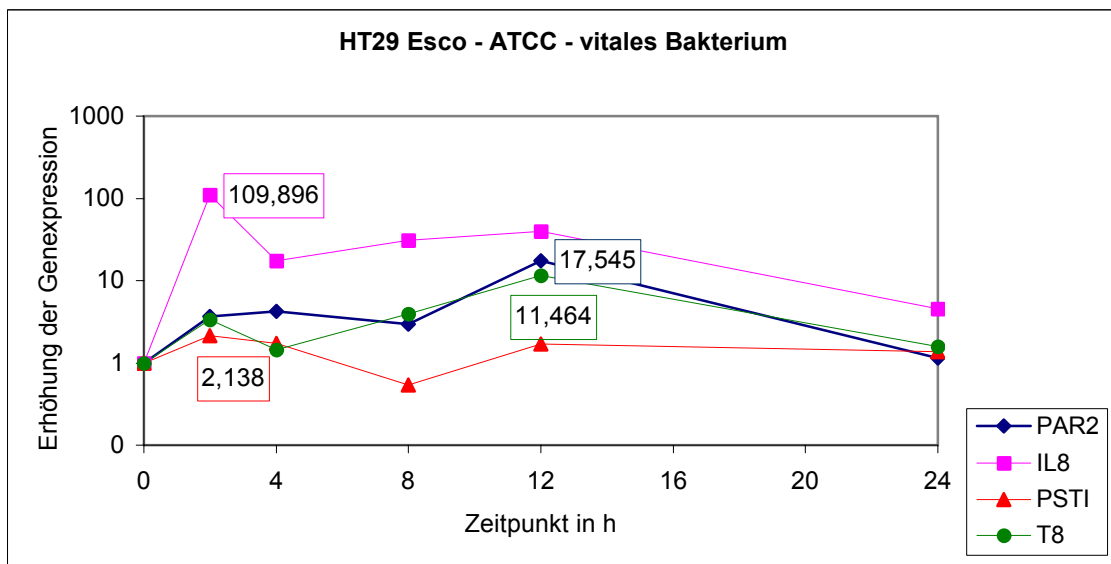
Yersinia enterocolitica (invasiv, gram neg.) resultierte nur in einer schwachen Regulation von IL8 (HT29: 12h – 19fach; Caco2: 4h – 1,4fach) und PAR2 (HT29: 24h – 2fach; Caco: 4h – 2fach). PSTI zeigte bei beiden Zelllinien nur eine geringe Regulation in der Frühphase (HT29: 2h – 2fach; Caco2: 12h – 1,4fach) und bei HT29 eine Suppression in der Spätphase (24h – 0,6fach). T8 wurde bei HT29 und Caco2 in der Frühphase ähnlich mit einem Anstieg (HT29: 2h – 5fach; Caco2: 12h – 3fach) reguliert. HT29 zeigte zudem eine Suppression in der Spätphase (24h – 0,5fach).

3.2.2. Stimulation HT29 und Caco2 mit Bakterien – Versuchsaufbau 2

Im zweiten Versuchsaufbau wurden die beiden intestinalen Epithelzelllinien HT29 und Caco2 mit drei verschiedenen pathogenen Stämmen von *Escherichia coli* (*Escherichia coli* Typ: EPEC – enteropathogen - ATCC 700790, *Escherichia coli* Typ: EHEC O157 - enterohämorrhagisch und *Escherichia coli* Typ: Nissle 1917) beimpft. Dabei wurde die Reaktion der beiden intestinalen Zelllinien HT29 und Caco2 pro Bakterium zudem auf 3 verschiedene Weisen bestimmt. Zum einen wurde die Reaktion auf vitale Bakterien gemessen. Zweitens wurden die Zellen mit den hitzeinaktivierten Bestandteilen der 3 Bakterienstämme versetzt. Und abschließend wurden die Zellen mit den steril filtrierten Überständen in Kontakt gebracht und die Auswirkung auf die Genexpression bestimmt. Wie im ersten Versuchsaufbau wurden zunächst IL8, PAR2, PSTI und T8 gemessen. Hinzukommend wurde bei diesem Versuch die Reaktion der Zellen auf das Expressionsmuster der antibakteriell wirkenden Defensine hBD1 und hBD2 untersucht, um genauere Aussagen über den stärksten Induktor dieser antibakteriell wirkenden Peptide machen zu können.

3.2.2.1. Stimulation HT29 mit Bakterien – Versuchsaufbau 2

Escherichia coli (ATCC 700790) führte zu einer biphasischen Regulation mit einem raschen Anstieg der IL8 Expression nach 2 Stunden auf das 110fache, um dann nach 4 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 17facher Expression abzufallen. Innerhalb von 12 Stunden kam es zu einem erneuten Anstieg der IL8 Expression auf das 39fache. Die Expression von PAR2 wurde ebenfalls biphasisch reguliert und erreichte nach 4 Stunden ein erstes Maximum mit 4facher Expression, um nach 8 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 3fach abzufallen und nach 12 Stunden mit einer 17,5facher Expression den maximalen Anstieg zu erreichen und dann bis 24 Stunden wieder auf den Ausgangswert abzufallen. PSTI erreichte wie IL8 nach 2 Stunden ein Maximum mit 2facher Steigerung der Genexpression, um nach 8 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum mit 0,5facher Expression abzufallen und nach 12 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau anzusteigen. T8 zeigte wie auch IL8, PAR2 und PSTI einen biphasischen Verlauf mit einem initialen Maximum mit 3fachem Anstieg nach 2 Stunden, einem zwischenzeitlichen Minimum mit 1,5facher Expression nach 4 Stunden um dann nach 12 Stunden auf ein Maximum mit 11fach gesteigerter Genexpression anzusteigen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

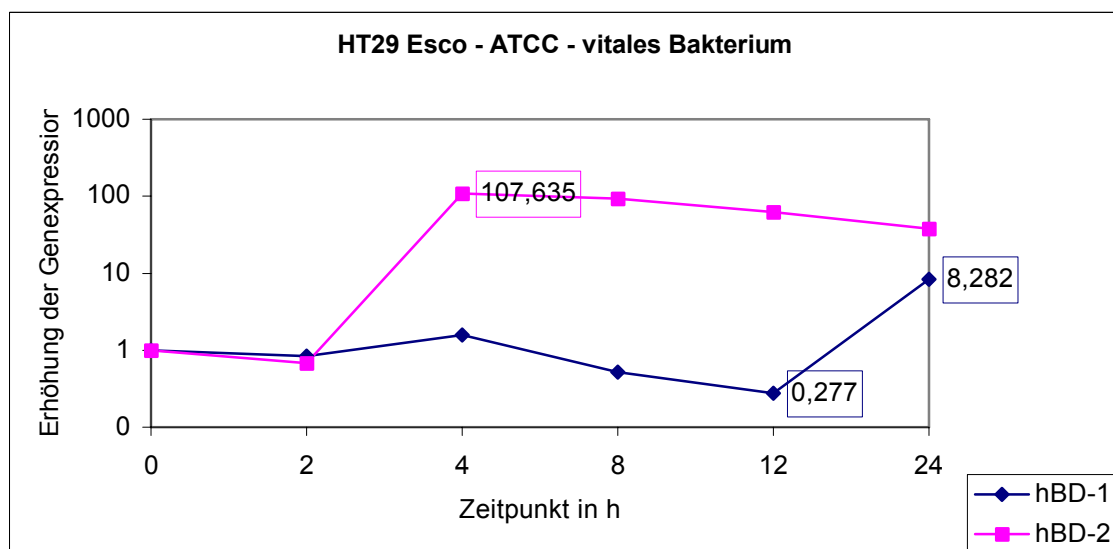
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien/ Well einer
6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

HT29 zeigten nach Zugabe von *Escherichia coli* (ATCC 700790) nach initialem Abfall der Genexpression von hBD-1 und hBD-2 eine Steigerung der Genexpression beider Gene. Die Genexpression von hBD-1 stieg nach dem initialem Abfall nach 4 Stunden auf das 1,6fache, um zwischenzeitlich nach 12 Stunden auf ein Viertel der Basisexpression abzufallen und um dann nach 24 Stunden einen maximalen Anstieg mit 8facher Steigerung der Genexpression zu erreichen. Bei hBD-2 war nach 4 Stunden ein Anstieg auf das 107fache zu beobachten, um nachfolgend innerhalb von 24 Stunden auf das 39fache abzufallen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

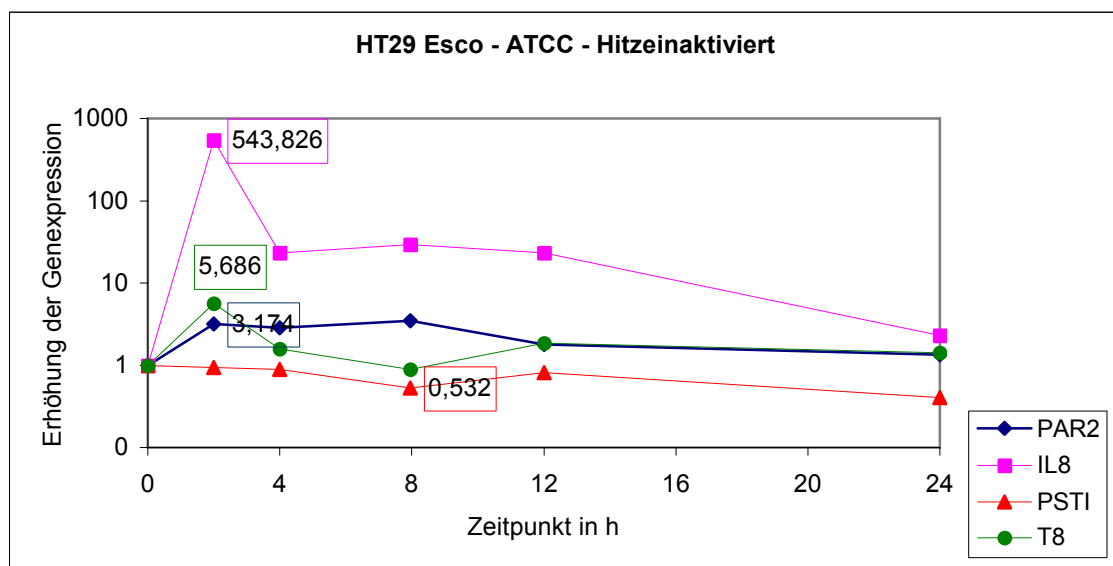
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien/ Well einer
6-Well Platte

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Das hitzeinaktivierte Bakterium *Escherichia coli* (ATCC 790700) führte zu einem raschen monophasischen Anstieg der IL8 Expression auf das 543fache des Ausgangswertes nach 2 Stunden, um sich dann innerhalb von 24 Stunden wieder der Basisexpression anzunähern. PAR2 wurde ebenfalls wie IL8 monophasisch exprimiert und stieg nach 2 Stunden auf das 3fache an, wobei dieses Level der Genexpression bis zu 8 Stunden bestehen blieb, um nachfolgend auf den Ausgangswert abzufallen. PSTI wurde biphasisch reguliert und wurde nach 8 Stunden auf das 0,5fache supprimiert, um sich nachfolgend zwischenzeitlich wieder dem Basisniveau der Expression anzunähern und nach 24 Stunden ein Minimum mit 0,4facher Expression zu erreichen. T8 zeigte nach dem Kontakt mit den hitzeinaktivierten Überresten einen raschen Anstieg nach 2 Stunden auf das 3fache, um sich zwischenzeitlich nach 8 Stunden dem Ausgangswert zu nähern und nachfolgend nochmals gering auf das 2fache anzusteigen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

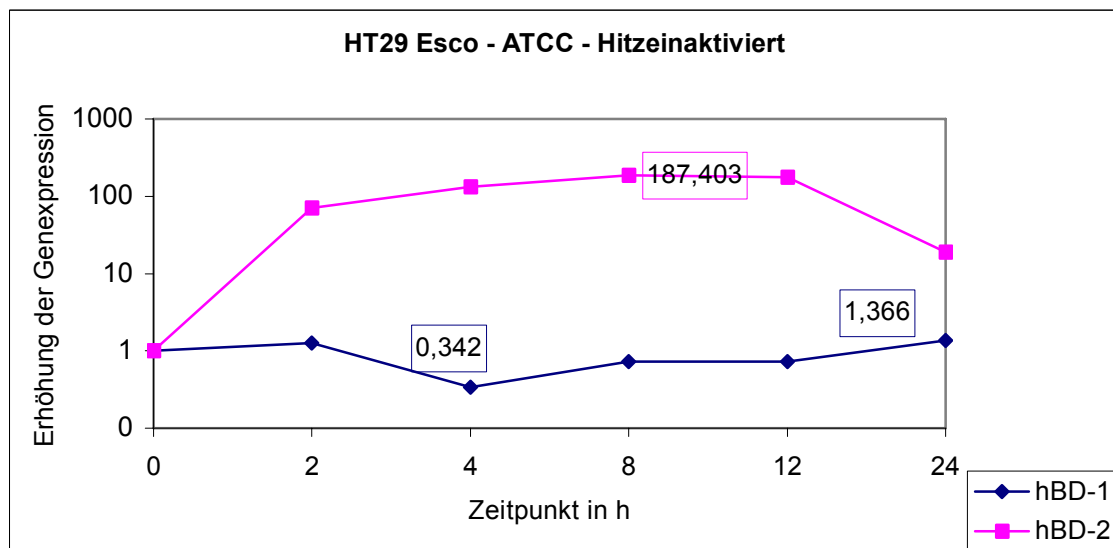
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Nach Kontakt von HT29 mit dem hitzeinaktivierten Bakterium *Escherichia coli* (ATCC 790700) wurde die Expression von hBD-1 biphasisch reguliert und zeigte nach anfänglicher geringer Steigerung eine Supression auf das 0,3fach, um nach 24 Stunden bis auf das 1,4fache anzusteigen. Bei hBD-2 kam es zu einem raschen Anstieg der Genexpression innerhalb von 2 Stunden auf das 71fache, um nachfolgend über 12 Stunden ein Maximum mit 187facher Genexpression zu erreichen und danach wieder abzufallen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

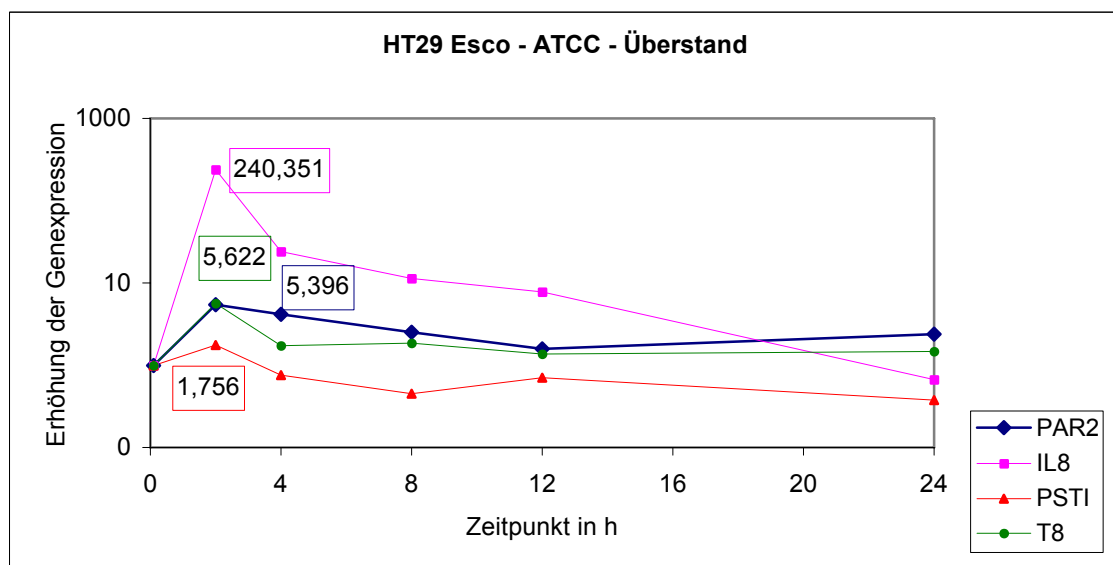
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Die Stimulation von HT29 mit dem Überstand von *Escherichia coli* (ATCC 790700) bewirkte einen raschen Anstieg nach 2 Stunden auf das 240fache der IL8 Basisexpression, um sich nachfolgend über 24 Stunden wieder dem Ausgangswert anzunähern. PAR2 wurde biphasisch reguliert und erreichte nach 2 Stunden eine Maximum mit 5facher Steigerung der Genexpression, um zwischenzeitlich gering abzufallen und nach 24 Stunden erneut auf das Doppelte anzusteigen. PSTI stieg zunächst nach 2 Stunden auf das Doppelte der Grundexpression an, um sich zwischenzeitlich der Grundexpression erneut anzunähern und dann auf das 0,5fache supprimiert zu werden. T8 wurde ebenfalls wie IL8 monophasisch reguliert und stieg nach 2 Stunden auf das 5fache an, um sich nach 4 Stunden wieder der Basisexpression anzunähern.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

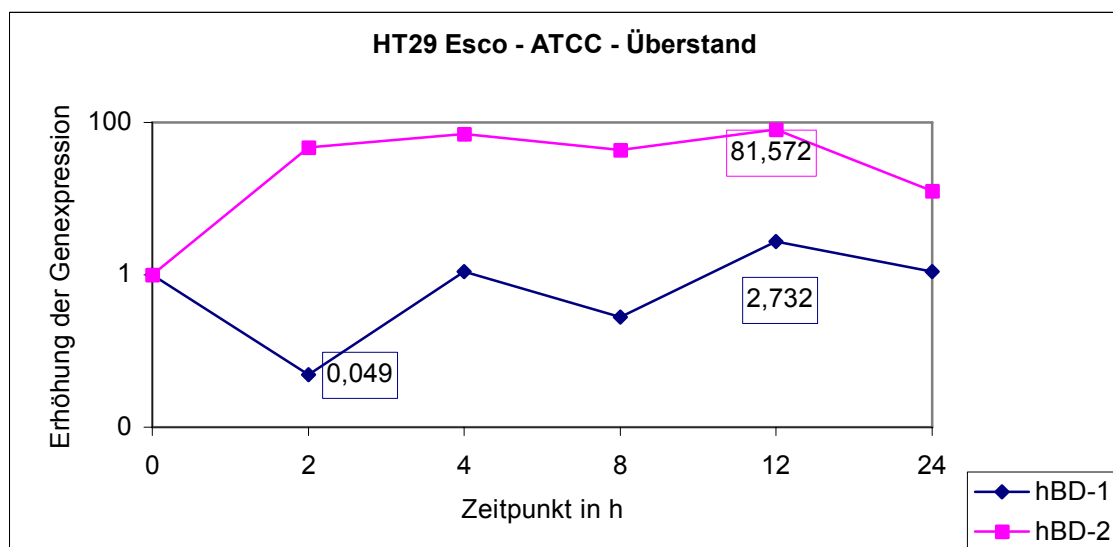
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Der Überstand von *Escherichia coli* (ATCC 790700) führte bei HT29 zu einer Suppression von hBD-1 nach 2 Stunden auf das 0,05fache, um nach 12 Stunden auf ein Maximum mit 3facher Genexpression anzusteigen. Die hBD-2 Expression zeigte einen monophasischen Verlauf mit einem initialen Anstieg nach 2 Stunden mit 50facher Genexpression. Die Steigerung blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten und erreichte nach 12 Stunden ein Maximum mit 81facher Genexpression.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

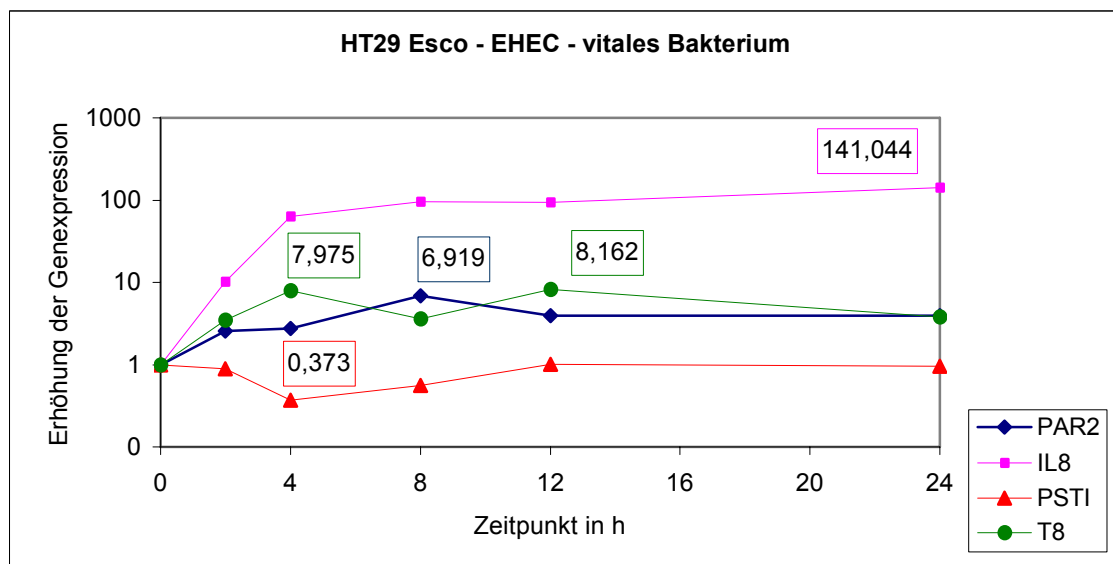
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Escherichia coli (EHEC 0157) führte zu einem raschen Anstieg der IL8 Expression nach 4 Stunden auf das 65fach, um im weiteren Verlauf innerhalb von 24 Stunden auf das 141fach anzusteigen. Die Expression von PAR2 wurde ebenfalls wie IL8 monophasisch reguliert und erreichte nach 8 Stunden ihr Maximum mit 7fach gesteigerter Expression. Die PSTI Genexpression wurde nach 4 Stunden mit 0,4facher Expression supprimiert, um innerhalb des gemessenen Zeitraumes wieder den Ausgangswert zu erreichen. Die Genexpression von T8 wurde nach Zugabe von Escherichia coli (EHEC 0157) biphasisch exprimiert und stieg nach 8 Stunden auf das 8fache an, um sich zwischenzeitlich dem Ausgangswert anzunähern und nach 12 Stunden erneut auf das 8fache anzusteigen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

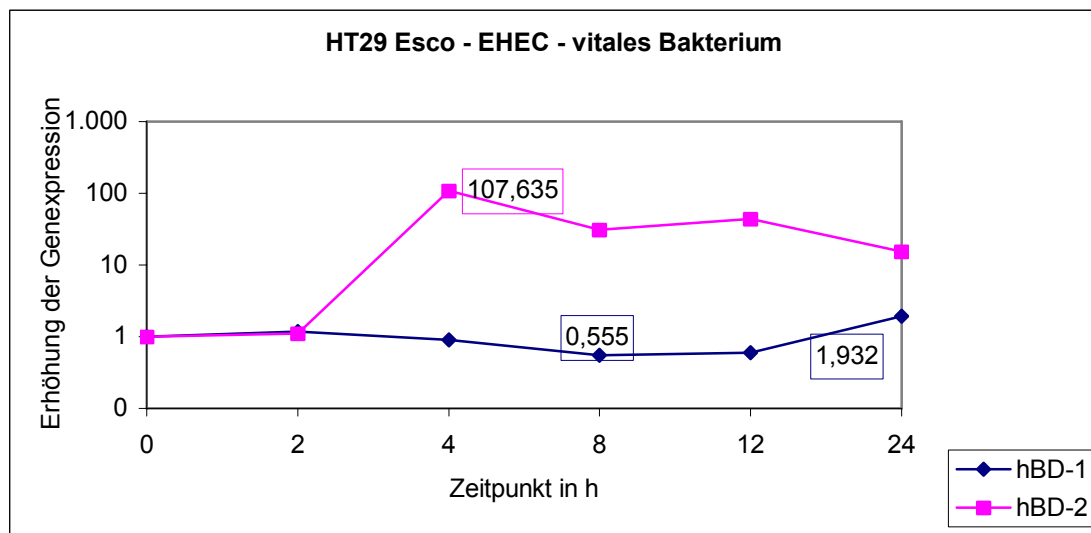
Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Das vitale Bakterium des Escherichia coli Stammes (EHEC 0157) führte bei HT29 zu einer initialen Suppression der Genexpression von hBD-1 und erreichte ein Minimum nach 8 Stunden mit 0,5facher Expression. In der Folge stieg die Genexpression innerhalb von 24 Stunden gering auf das 2fache an.

Die hBD-2 Genexpression zeigte eine monophasische Steigerung mit einem Anstieg nach 4 Stunden auf das 107fache, um im Verlauf wieder auf das 15fache der Basisexpression abzufallen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

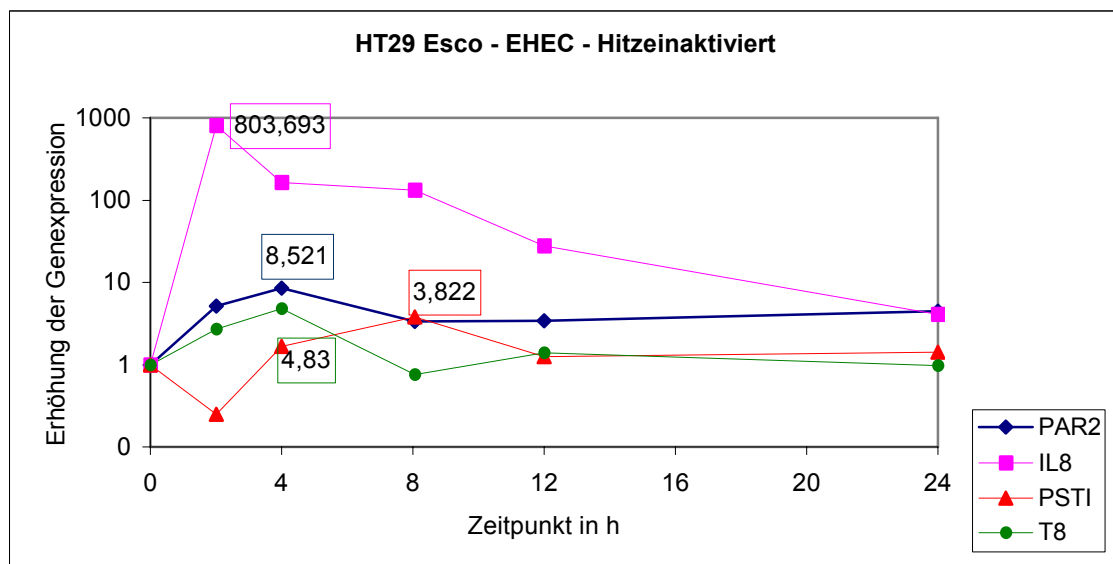
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Das hitzeinaktivierte Bakterium *Escherichia coli* (EHEC 0157) führte zu einem raschen Anstieg der IL8 Expression nach 2 Stunden auf das 800fache des Ausgangswertes, um sich im Verlauf von 24 Stunden wieder dem Ausgangswert anzunähern. PAR2 erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 8,5facher Genexpression, um nachfolgend abzufallen und über den gesamten Beobachtungszeitraum 3fach gesteigert zu bleiben. Die Expression von PSTI wurde initial nach 2 Stunden auf das 0,25fache supprimiert, um zwischenzeitlich auf ein Maximum mit 4facher Expression anzusteigen und gegen Ende des Beobachtungszeitraumes wieder auf die Basisexpression abzufallen. T8 zeigte eine biphasische Regulation mit einem Anstieg nach 4 Stunden auf das 5fache, einem zwischenzeitlichen Abfall auf 0,75fach, um im weiteren Verlauf wieder das Ausgangsniveau zu erreichen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

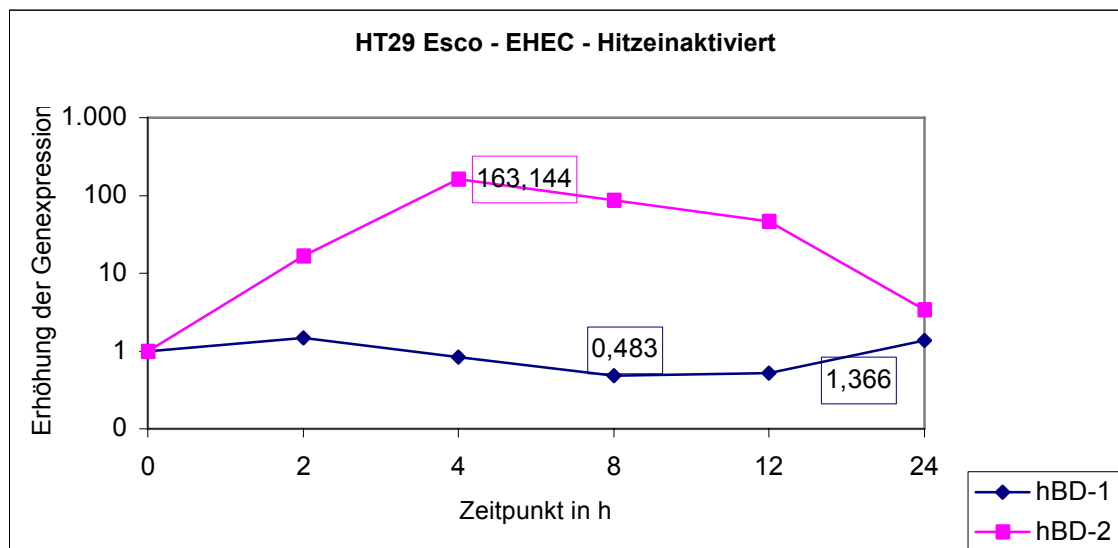
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Die Stimulation von HT29 mit den hitzeinaktivierten Überresten von *Escherichia coli* (EHEC 0157) führte bei hBD-1 zu einer geringen Steigerung der Genexpression nach 2 Stunden auf das 1,5fache, um zwischenzeitlich nach 8 Stunden auf ein Minimum von 0,4fach supprimiert zu werden und nachfolgend nach 24 Stunden schwach auf das 1,4fache anzusteigen. hBD-2 zeigte nach 4 Stunden einen raschen Anstieg mit 163facher Expression, um innerhalb von 24 Stunden wieder auf den Ausgangswert abzufallen.



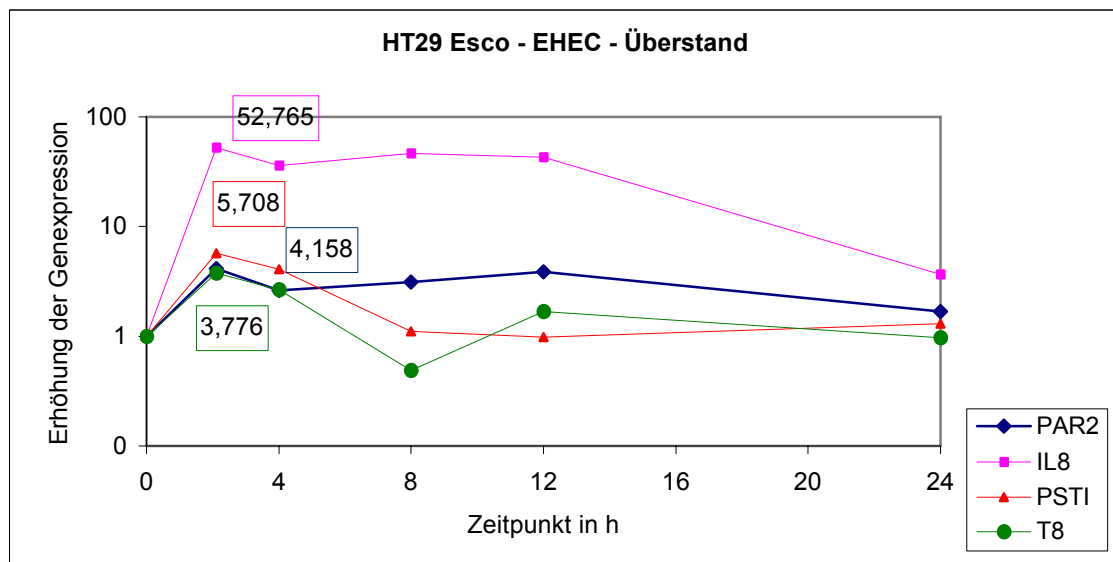
Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Der Überstand von Escherichia coli (EHEC 0157) führte nach 2 Stunden zu einem raschen Anstieg der IL8 Expression auf das 52fache, um zwischenzeitlich gering abzufallen und dann bis 12 Stunden auf das 40fache gesteigert zu bleiben. Nachfolgend näherte sich die IL8 Expression wieder dem Ausgangswert an. PAR2 zeigte einen ähnlichen biphasischen Verlauf wie IL8 mit einem Maximum nach 2 Stunden mit 4facher Expression, um nach 4 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 2,5facher Expression abzufallen. In der Folge stieg die PAR2 Expression nach 12 Stunden erneut auf das 4fache an, um sich nach 24 Stunden dem Ausgangswert anzunähern. PSTI wurde nach 2 Stunden auf das 6fache gesteigert, um im weiteren Verlauf wieder den Ausgangswert zu erreichen. T8 wurde biphasisch reguliert und zeigte nach 2 Stunden einen Anstieg auf das 3,8fache der Grundexpression, um nach 8 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 0,5facher Expression supprimiert zu werden und gegen Ende nach 24 Stunden wieder das Ausgangsniveau zu erreichen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

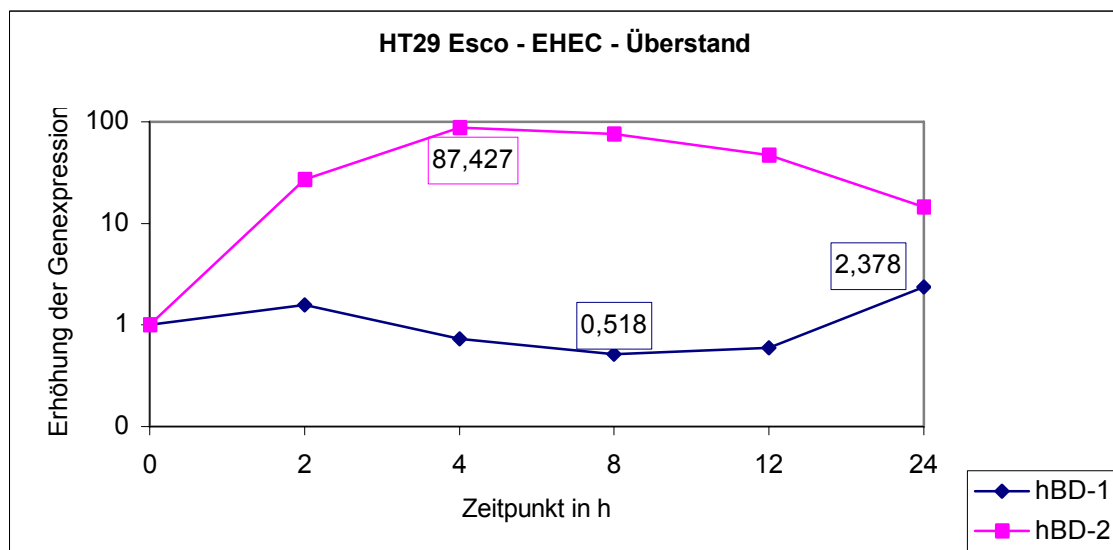
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Der Überstand von EHEC führte nach einem initialen Anstieg der hBD-1 Expression nach 2 Stunden auf das 1,5fache zu einer zwischenzeitlichen Suppression mit einem Minimum nach 8 Stunden mit 0,5fach, um im weiteren Verlauf nach 24 Stunden auf das 2,4fache anzusteigen. Die hBD-2 Genexpression erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 87facher Steigerung, um in der Folge nach 24 Stunden auf das 14fache abzufallen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

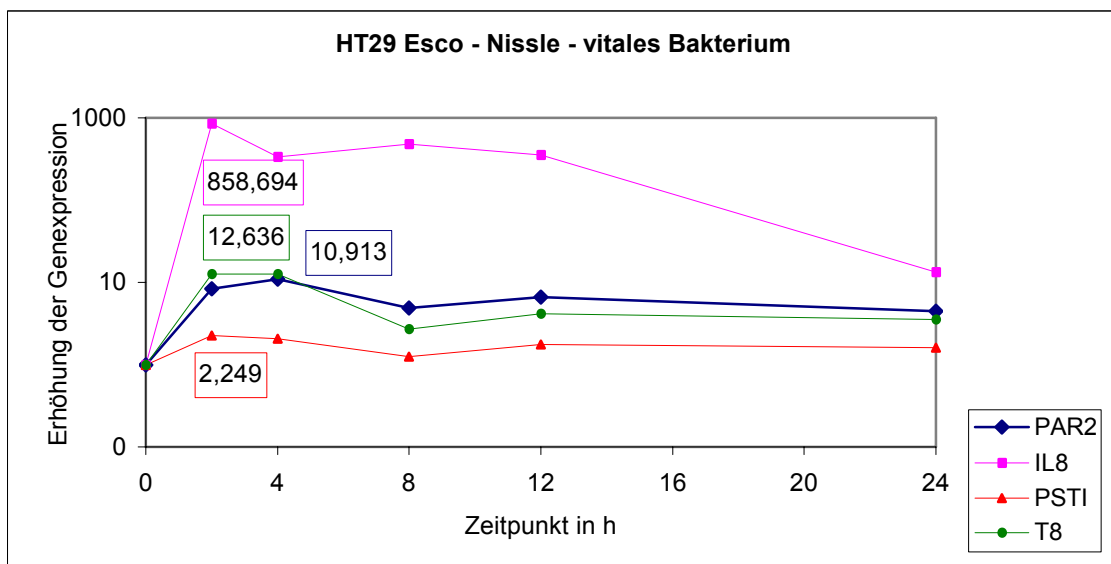
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Escherichia coli Nissle 1917 führte bei HT29 zu einer biphasischen Regulation mit einem raschen Anstieg der IL8 Expression nach 2 Stunden auf das 860fache der Grundexpression, um zwischenzeitlich nach 4 Stunden auf das 330fache abzufallen und nach 8 Stunden erneut auf das 489fache anzusteigen. In der Folge fiel die IL8 Expression erneut gering auf das 13fache, erreichte jedoch nicht das Ausgangsniveau. Die PAR2 Expression stieg ebenfalls, wie IL8, innerhalb von 2 Stunden auf das 10fache an und erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 11facher Steigerung der Genexpression, um nachfolgend zunächst nach 8 Stunden auf das 5fache des Ausgangswertes abzufallen und im Verlauf wieder nach 12 Stunden auf das 7fache anzusteigen. PSTI zeigte einen ähnlichen Verlauf mit einem initialen Anstieg der Genexpression auf das 2fache, um nach 8 Stunden wieder den Ausgangswert zu erreichen und nachfolgend innerhalb von 24 Stunden wieder auf das 2fache anzusteigen. Die Expression von T8 wurde ebenfalls mit einem initialen Anstieg nach 2 Stunden auf das 13fache reguliert, um im weiteren Verlauf über den gemessenen Zeitraum gering mit 3- bis 4fach gesteigert zu bleiben.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

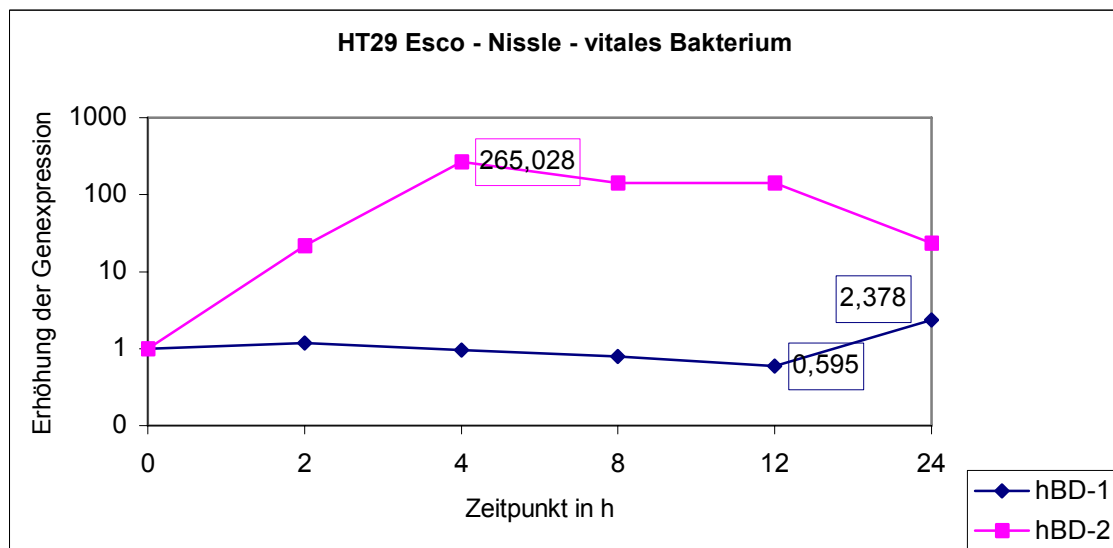
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Das vitale Bakterium *Escherichia coli* Nissle 1917 führte anfangs zu kaum einer messbaren Regulation von hBD-1, um nach 12 Stunden auf zwischenzeitliches Minimum mit 0,6facher Expression abzufallen und nachfolgend nach 24 Stunden auf das 2fache des Ausgangswertes anzusteigen. Die Expression von hBD-2 wurde monophasisch reguliert und erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 265fach, um im weiteren Verlauf abzufallen und nach 24 Stunden noch mit 23facher Genexpression gesteigert zu sein.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

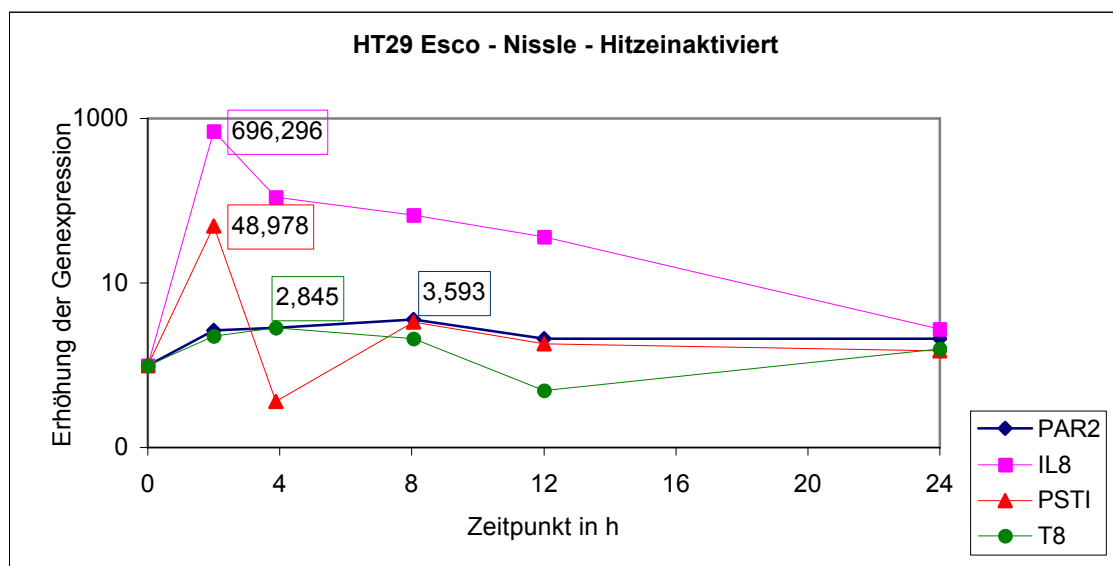
Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Das hitzeinaktivierte Bakterium *Escherichia coli* Stamm – Nissle 1917 führte zu einem raschen monophasischen Anstieg der IL8 Expression nach 2 Stunden auf das 696fache, um sich nachfolgend über 24 Stunden wieder dem Ausgangswert anzunähern.

PAR2 wurde ebenfalls monophasisch reguliert und erreichte nach 8 Stunden ein Maximum mit 3,6facher Steigerung der Genexpression nach 8 Stunden. In der Folge blieb PAR2 im Beobachtungszeitraum auf das 2fache gesteigert. PSTI zeigte genau wie IL8 nach 2 Stunden einen raschen Anstieg auf das 49fache, um dann nach 4 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 0,4facher Expression abzufallen und nachfolgend wieder nach 8 Stunden auf das 3fache gesteigert zu sein. Im weiteren Verlauf näherte sich die Expression dem Ausgangswert an, blieb jedoch nach 24 Stunden schwach auf das 1,8fache erhöht. T8 zeigte einen ähnlichen Verlauf wie PAR2 mit einem Anstieg nach 4 Stunden auf das 3fache, um zwischenzeitlich nach 12 Stunden auf 0,5 supprimiert zu sein und sich dann wieder dem Ausgangswert anzunähern.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

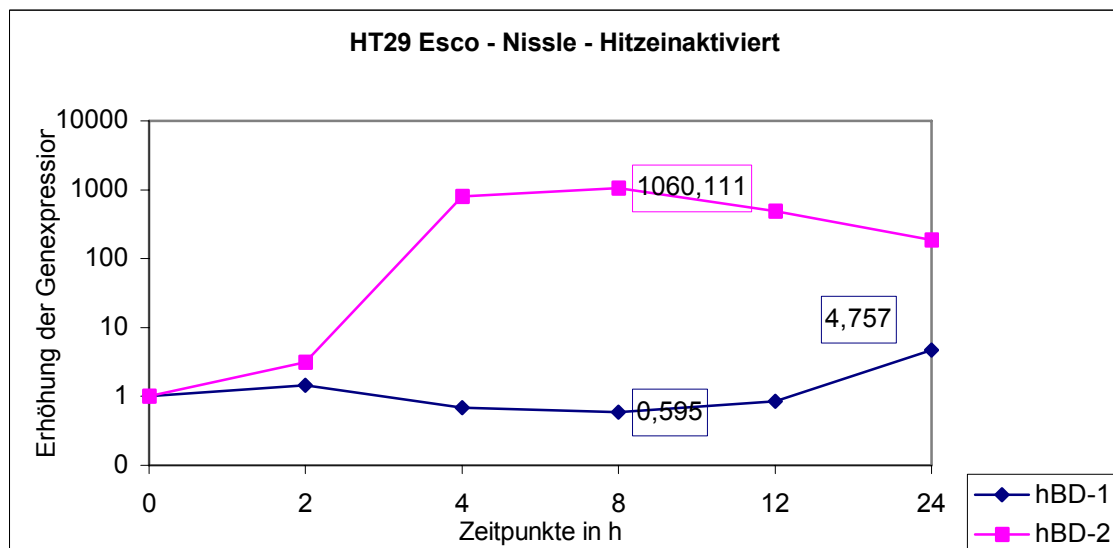
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Das hitzeinaktivierte Bakterium *Escherichia coli* Nissle 1917 führte zu einem schwachen Anstieg der hBD-1 Expression nach 2 Stunden auf das 1,5fache, um nach 8 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum mit 0,6facher Expression abzufallen und gegen Ende des Beobachtungszeitraumes nach 24 Stunden maximal auf das 4,8fache gesteigert zu sein. hBD-2 wurde anfangs nur gering reguliert, stieg nach 4 Stunden rasch an und erreichte nach 8 Stunden ein Maximum mit 1060facher Steigerung der Genexpression. Auch gegen Ende des Beobachtungszeitraumes blieb hBD-2 nach 24 Stunden auf das 187fache gesteigert.



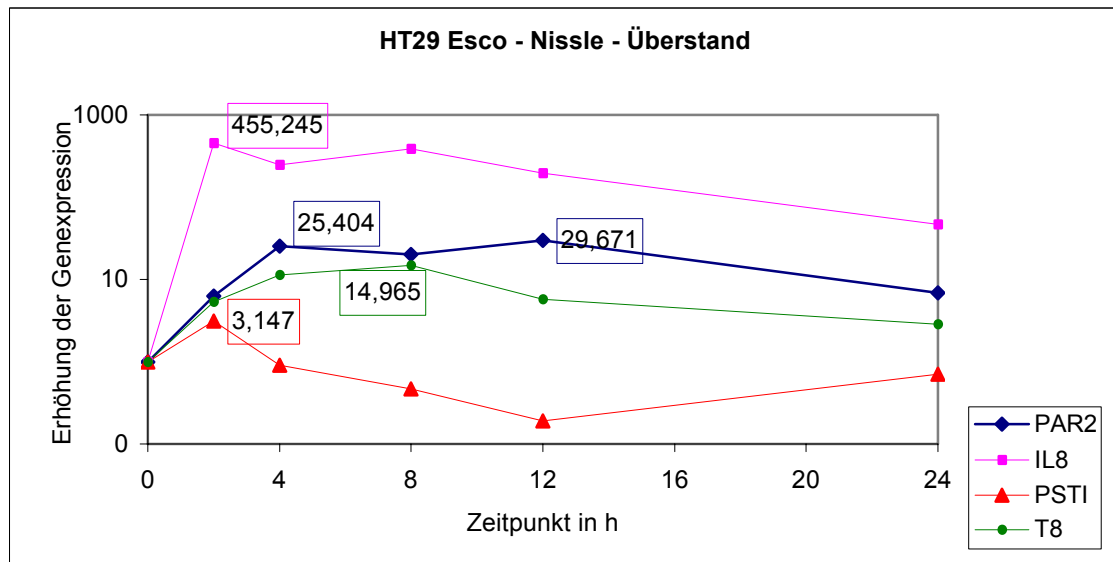
Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Der Überstand von *Escherichia coli* Nissle 1917 führte zu einem raschen Anstieg der IL8 Expression nach 2 Stunden auf das 455fache des Ausgangswertes, um dann nach 4 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum mit 250facher Expression abzufallen und nachfolgend nach 8 Stunden erneut auf das 400fache anzusteigen. In der Folge fiel die Expression von IL8 nach 24 Stunden auf das 47fache ab. Die Expression von PAR2 stieg zunächst nach 4 Stunden auf das 25fache an, um in der Folge nach 8 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 20fachen Expression abzufallen. Im Verlauf zeigte sich nach 12 Stunden ein erneuter Anstieg auf das 30fache des Ausgangswertes, um danach nach einem Abfall nach 24 Stunden noch auf das 8fache gesteigert zu bleiben. PSTI zeigte einen schnellen Anstieg nach 2 Stunden auf das 3fache, um nach 12 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum mit dem 0,2fachen der Grundexpression supprimiert zu werden und in der Folge nach 24 Stunden gering, aber weiterhin supprimiert auf das 0,7fache anzusteigen. Die T8 Genexpression erreichte bei einer monophasische Regulation nach 8 Stunden ein Maximum mit 15facher Steigerung der Genexpression, um nachfolgend wieder abzufallen und nach 24 Stunden noch auf das 3fache gesteigert zu bleiben.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

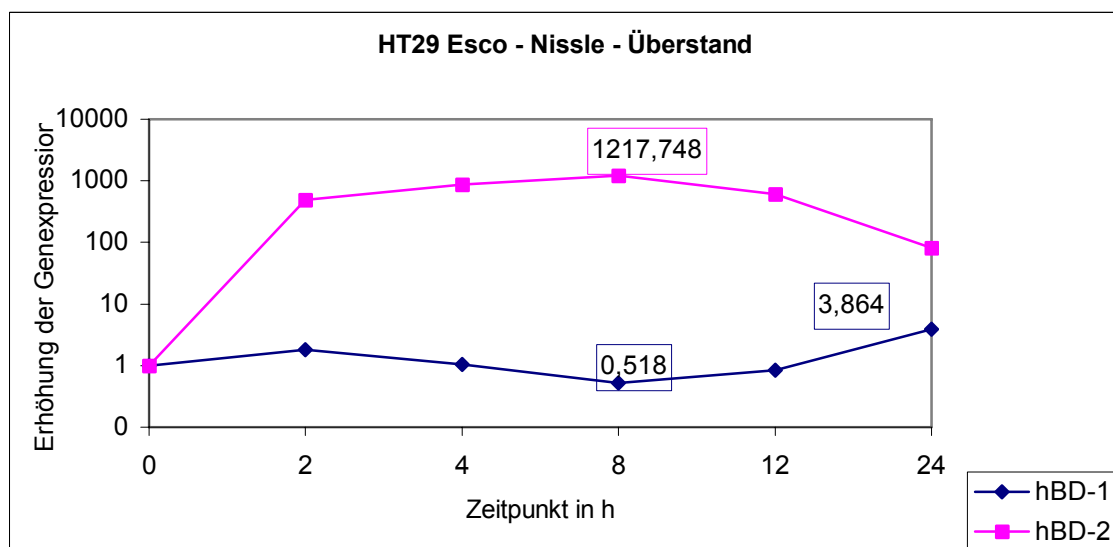
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation HT29 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Der Überstand von *Escherichia coli* Nissle 1917 führte zu einem geringen Anstieg der hBD-1 Expression nach 2 Stunden auf das 1,8fache des Ausgangswertes, um nachfolgend nach 8 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum mit 0,5facher Expression abzufallen und nach 24 Stunden wieder auf das 4fache des Ausgangswertes anzusteigen. Die Expression von hBD-2 zeigte nach 2 Stunden einen raschen Anstieg auf das 500fache, um nachfolgend nach 8 Stunden ein Maximum mit 1200facher Genexpression zu erreichen und dann im Verlauf nach 24 Stunden auf das 81fache abzufallen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie HT29

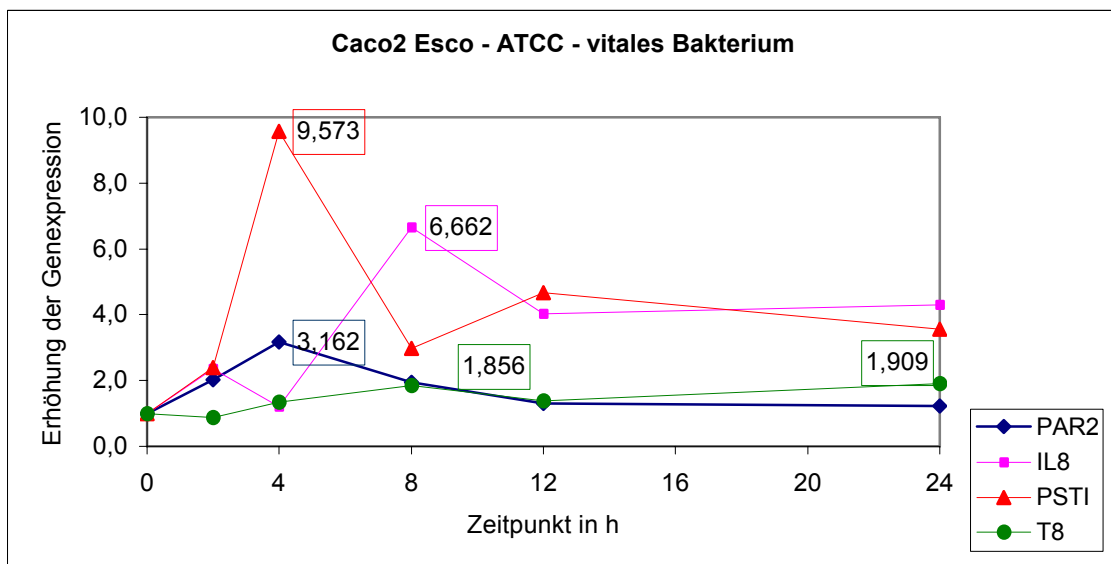
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

3.2.2.2. Stimulation Caco2 mit Bakterien im Versuchsaufbau 2

Escherichia coli (ATCC 700790) führte zu einem langsamen Anstieg der IL8 Expression nach 8 Stunden auf das 7fache des Ausgangswertes, um nachfolgend bis zu 24 Stunden bis zu 4fach erhöht zu bleiben. Die PAR2 Expression wurde monophasisch reguliert und erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 3facher Genexpression, um dann wieder auf das Ausgangsniveau abzufallen. *Esco* führte zu einem raschen Anstieg der Expression von PSTI mit einem Maximum nach 4 Stunden mit einer 9,6fachen Steigerung der Genexpression, um auf ein zwischenzeitliches Minimum mit 3facher Expression abzufallen und nach 12 Stunden erneut auf das 5fache des Ausgangswertes anzusteigen und nach 24 Stunden wieder gering abzufallen. T8 wurde schwach reguliert und stieg nach 8 Stunden initial auf das 1,9fach an, um zwischenzeitlich gering abzufallen und im Verlauf von 24 Stunden erneut auf das 1,9fache anzusteigen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

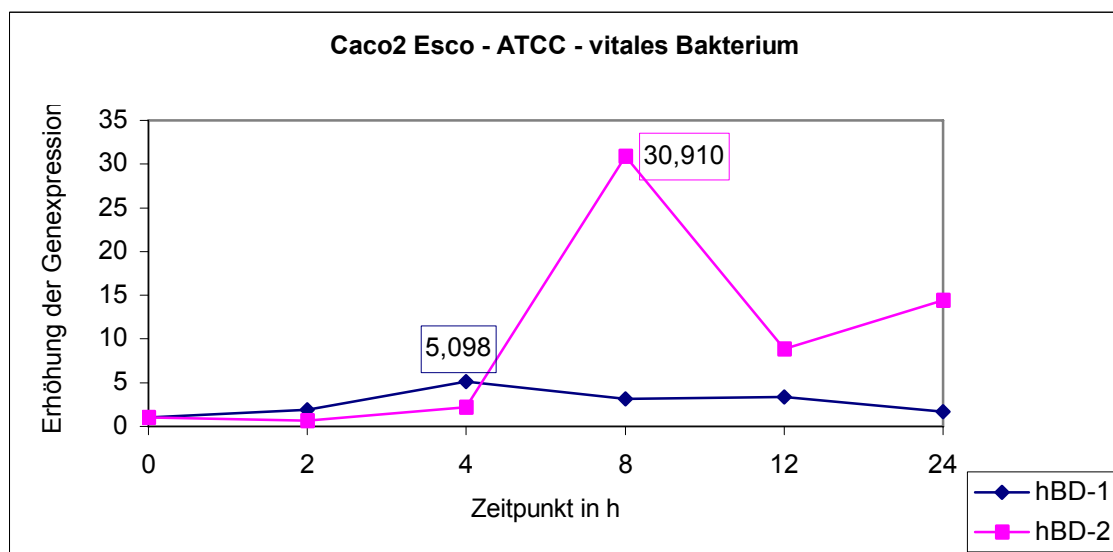
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Escherichia coli (ATCC 700790) führte zu einem verzögerten Anstieg der hBD-1 Genexpression nach 4 Stunden auf das 5fache, um im Verlauf wieder den Ausgangswert zu erreichen. hBD-2 stieg ebenfalls, genau wie hBD-1, verzögert nach 8 Stunden auf das 30fache an, um zwischenzeitlich nach 12 Stunden auf das 9fache des Basiswertes abzufallen und nach 24 Stunden erneut auf das 14fache anzusteigen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

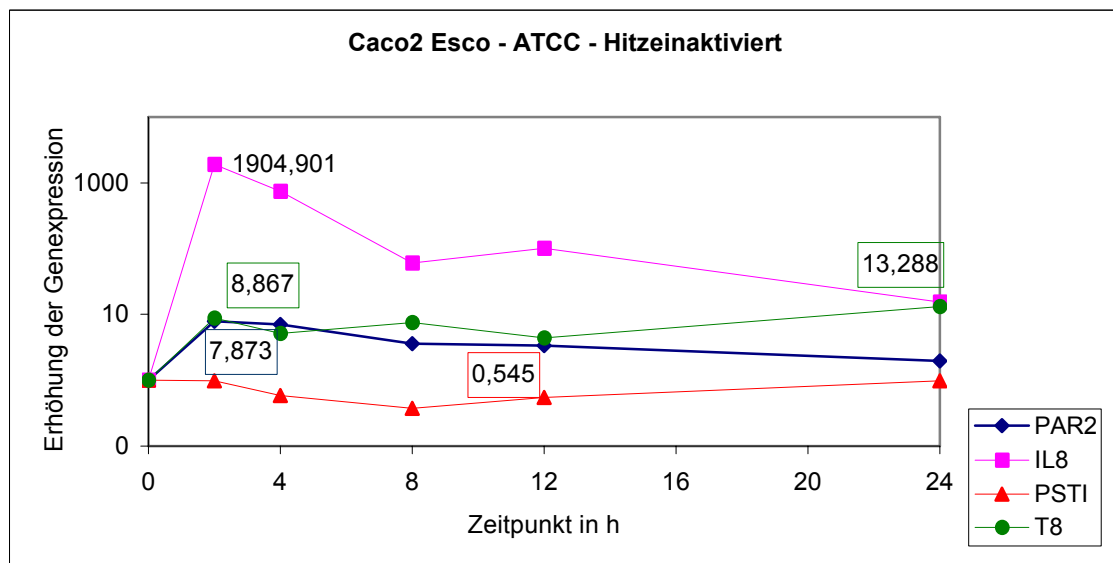
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Das hitzeinaktivierte Bakterium *Escherichia coli* (ATCC 700790) führte zu einem raschen Anstieg der IL8 Expression nach 2 Stunden auf das 1900fache des Ausgangswertes, um nach 8 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 61facher Expression abzufallen. Nach 12 Stunden stieg IL8 erneut auf das 100fache an, um nach 24 Stunden noch mit 15fach leicht erhöht zu sein. Die PAR2 Expression erreichte, genau wie IL8, das Maximum nach 2 Stunden mit 8facher Expression, um im weiteren Verlauf nach 24 Stunden langsam auf das 2fache abzufallen. Die Expression von PSTI wurde durch das hitzeinaktivierte Bakterium *Escherichia coli* (ATCC 700790) supprimiert und erreichte ein Minimum nach 8 Stunden mit 0,4fach. In der Folge stieg die Expression nach 24 Stunden wieder auf das Basisniveau an.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

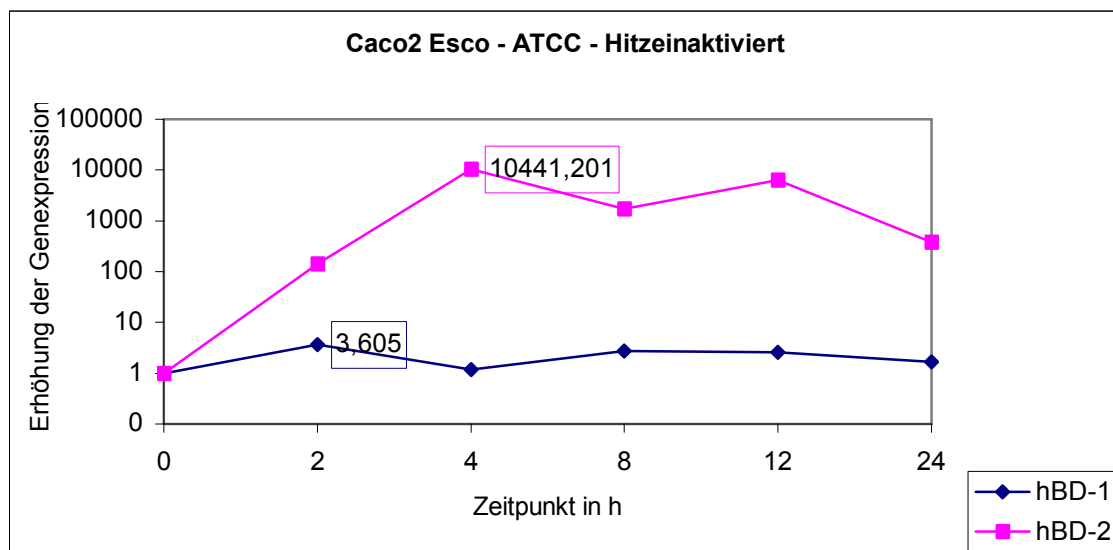
Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Das hitzeinaktivierte Bakterium *Escherichia coli* (ATCC 700790) führte zu einem mäßigen Anstieg der hBD-1 Expression nach 2 Stunden auf ein Maximum von 4fach, um nachfolgend nach 4 Stunden auf das Ausgangsniveau abzufallen, nach 8 Stunden erneut auf das 3fache des Ausgangswertes anzusteigen und sich nach 24 Stunden wieder dem Ausgangsniveau anzunähern.

Die Expression von hBD-2 zeigte nach 4 Stunden einen raschen Anstieg der Expression auf das 10000fache um nachfolgend nach 8 Stunden gering auf das 1700fache abzufallen. In der Folge stieg die hBD-2 Expression nach 12 Stunden erneut auf das 6427fache an, um nach 24 Stunden auf ein Minimum mit 374facher Expression abzusinken.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

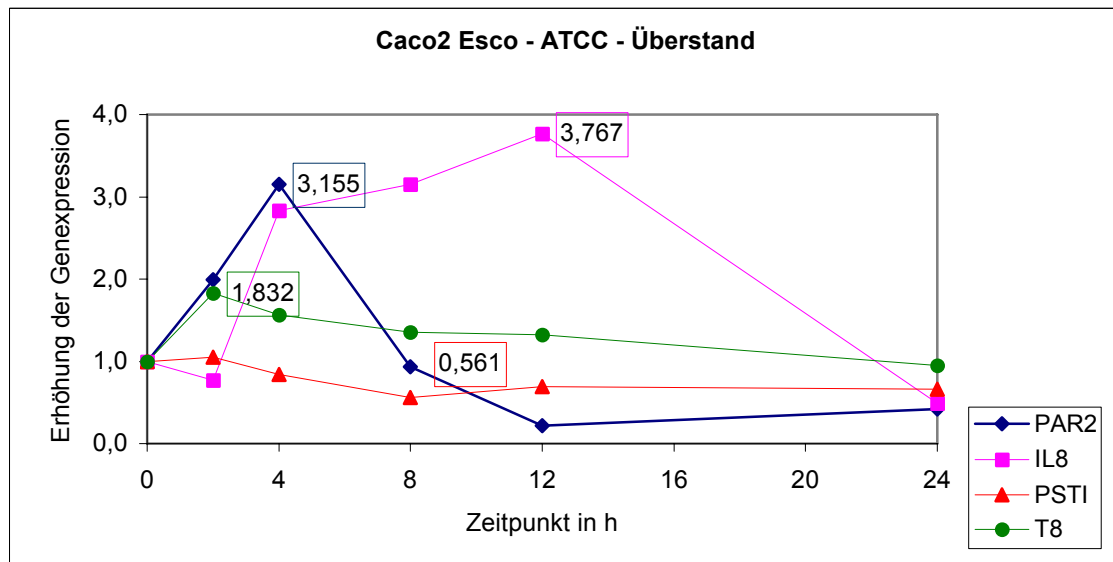
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Der Überstand von *Escherichia coli* (ATCC 700790) führte zu einem verzögerten Anstieg der Genexpression mit einem Maximum nach 12 Stunden auf das 4fache des Ausgangswertes. Die Expression von PAR2 erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 3facher Genexpression, um nachfolgend nach 12 Stunden auf das 0,2fache supprimiert zu werden und in der Folge gering auf das 0,4fache nach 24 Stunden anzusteigen. PSTI veränderte sich während der Zeit des Experimentes kaum.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

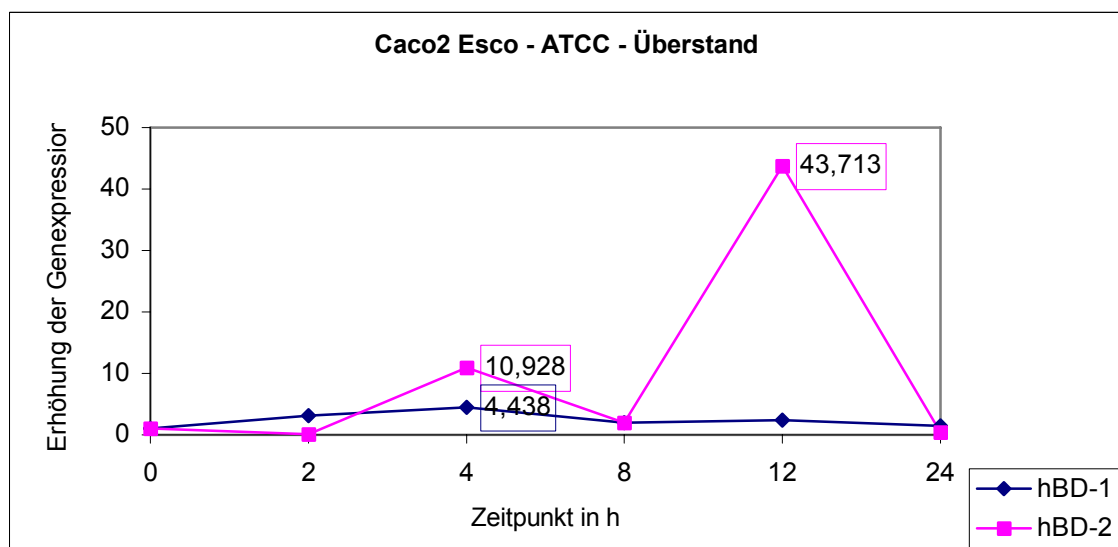
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Der Überstand von *Escherichia coli* (ATCC 700790) führte zu einem mäßigen Anstieg der hBD-1 Expression nach 4 Stunden auf das 4fache des Ausgangswertes, um sich nachfolgend wieder dem Basisniveau anzunähern. Die Expression von hBD-2 erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 11facher Basisexpression, um nachfolgend auf ein zwischenzeitliches Minimum von 2fach abzufallen. In der Folge stieg hBD2 erneut nach 12 Stunden auf das 43fache an, um im Verlauf von 24 Stunden auf das Ausgangsniveau abzufallen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

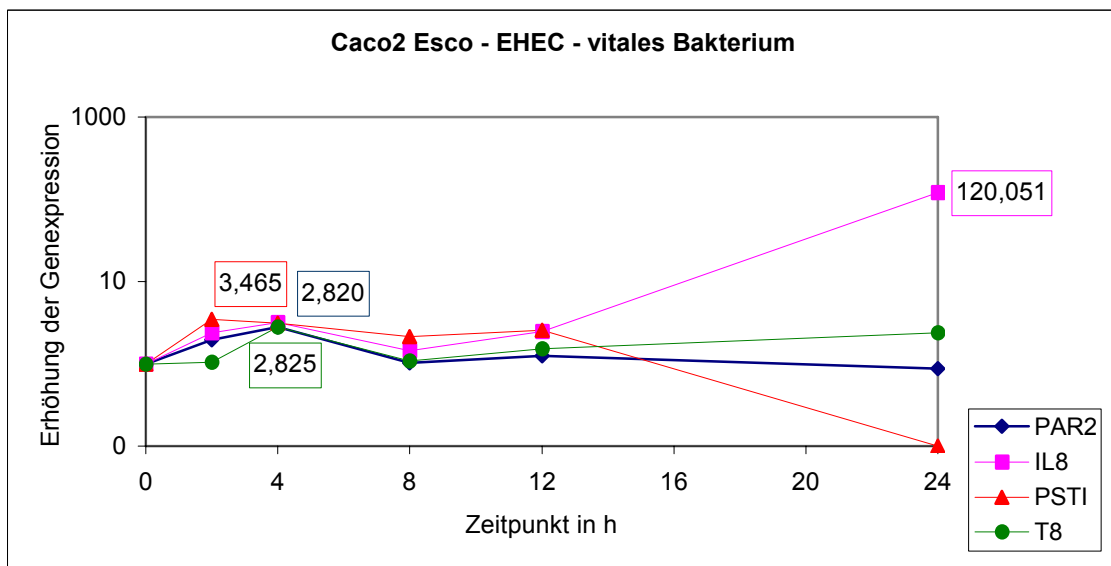
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Escherichia coli (EHEC 0157) führte zu einem ersten Anstieg der IL8 Expression nach 4 Stunden auf das 3fach, um nachfolgend auf ein zwischenzeitliches Minimum mit 1,5fach abzufallen und in der Folge nach 24 Stunden auf ein Maximum mit 120facher Genexpression anzusteigen. Die Expression von PAR2 erreichte ebenfalls nach 4 Stunden ein Maximum mit 3facher Erhöhung der Genexpression, um im weiteren Verlauf wieder auf das Ausgangsniveau abzufallen. Die PSTI Expression zeigte nach 2 Stunden einen raschen Anstieg auf das 3,5fache, um zwischenzeitlich nach 8 Stunden gering abzufallen und nach 24 Stunden auf 0,1 supprimiert zu sein. T8 wurde durch Escherichia coli (EHEC 0157) nach 4 Stunden zunächst auf das 3fache gesteigert, um nach 8 Stunden ein zwischenzeitliches Minimum im Ausgangsniveau zu erreichen und im weiteren Verlauf nach 24 Stunden wieder auf das 2,3fache anzusteigen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

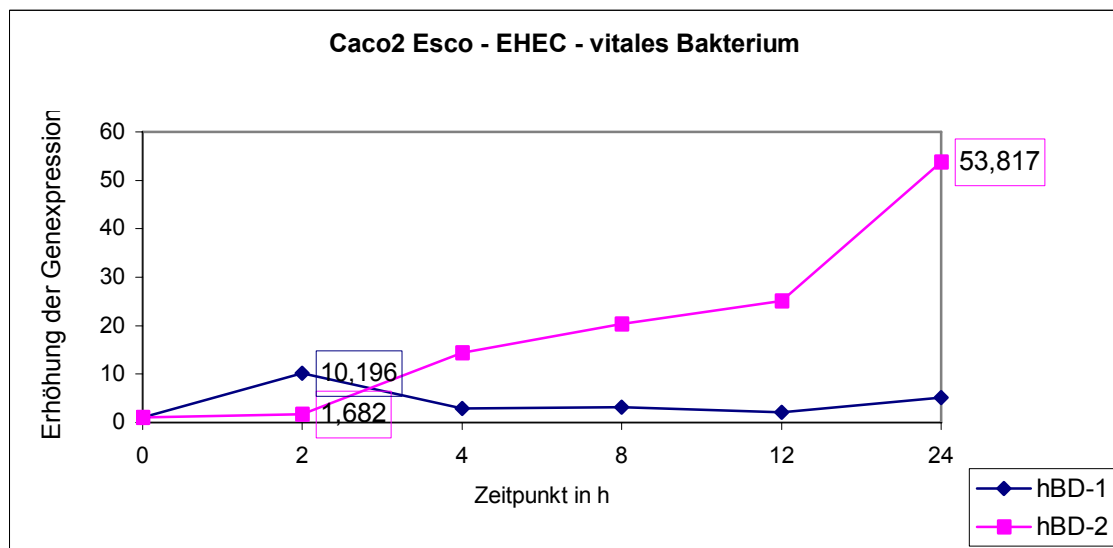
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Das vitale Bakterium Escherichia coli (EHEC 0157) führte zu einem raschen Anstieg der hBD-1 Expression nach 2 Stunden auf das 10fache des Ausgangswertes, um nachfolgend wieder auf das Ausgangsniveau abzufallen und nach 24 Stunden wieder auf das 5fache anzusteigen. Die Genexpression von hBD-2 zeigte nach 4 Stunden eine beginnende Steigerung und stieg im weiteren Verlauf nach 24 Stunden auf ein Maximum mit 53facher Expression an.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

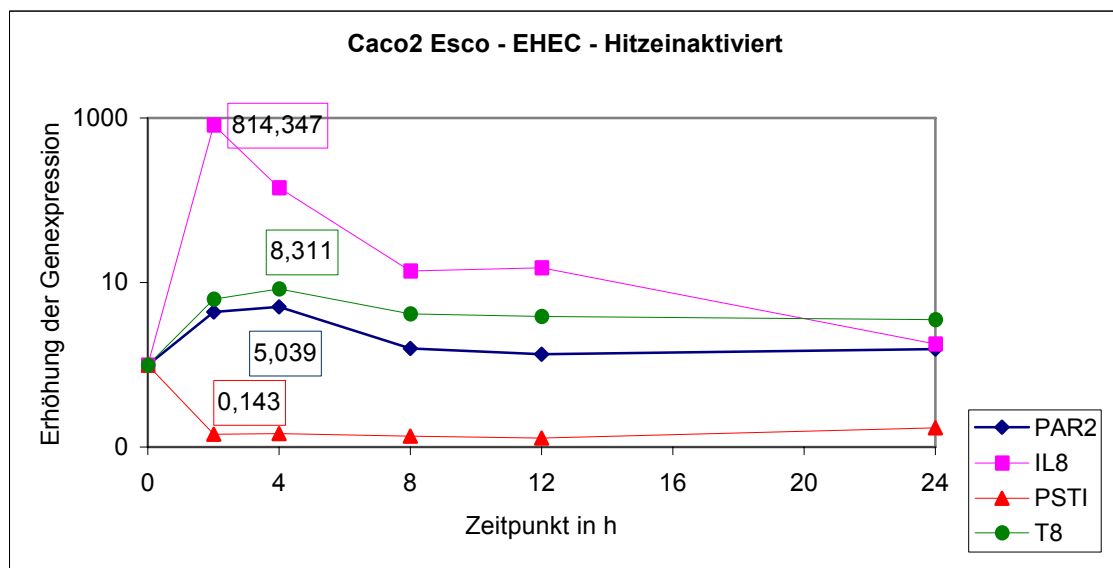
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Die hitzeinaktivierten Bestandteile von *Escherichia coli* (EHEC 0157) führte zu einem raschen Anstieg der IL8 Expression nach 2 Stunden auf das 814fache des Ausgangswertes, um im weiteren Verlauf über 24 Stunden langsam auf das Ausgangsniveau abzufallen. Die Expression von PAR2 wurde ebenfalls monophasisch reguliert und erreichte nach 4 Stunden ein Maximum von 5facher Genexpression, um sich, genau wie IL8, in der Folge wieder dem Ausgangsniveau anzunähern. Die PSTI Expression zeigte genau wie PAR2 nach 4 Stunden ein Maximum mit 8facher Genexpression, blieb jedoch innerhalb von 24 Stunden auf das 3,8fache gesteigert. T8 wurde durch die hitzeinaktivierten Bestandteile von *Escherichia coli* (EHEC 0157) nach 2 Stunden supprimiert und erreichte nach 12 Stunden ein Minimum mit 0,1facher Expression.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

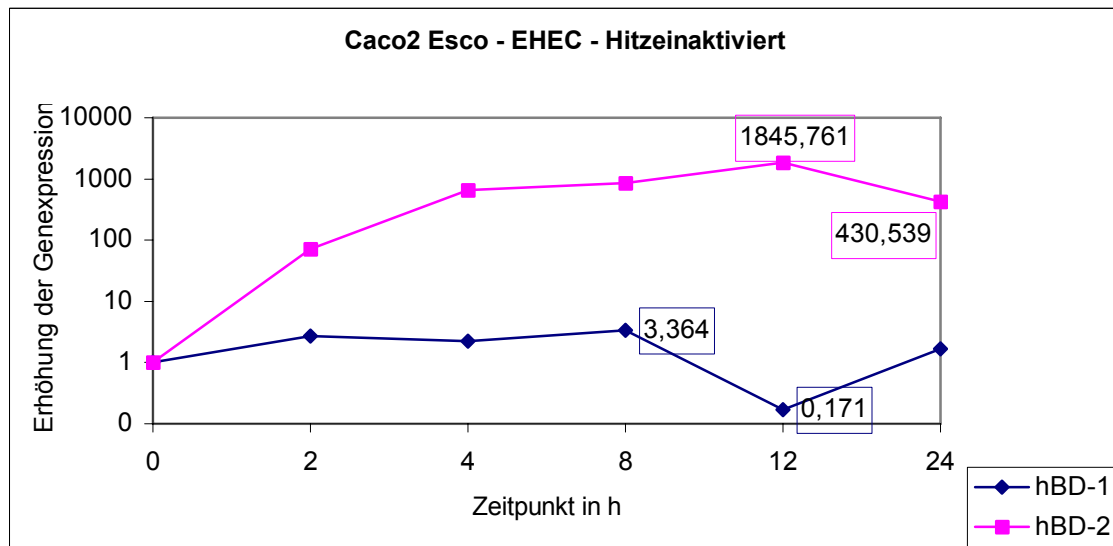
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Die hitzeinaktivierten Überreste von *Escherichia coli* (ATCC 25922) führten bei Caco2 zu einem verzögerten Anstieg der hBD-1 Genexpression auf das 3fache nach 8 Stunden, um zwischenzeitlich auf ein Minimum mit 0,2facher Expression abzufallen und nach 24 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau anzusteigen. Die Expression von hBD-2 wurde ebenfalls monophasisch reguliert und erreichte nach 12 Stunden ein Maximum mit dem 1845fachen des Ausgangswertes. In der Folge fiel die Expression nach 24 Stunden auf das 430fache ab.



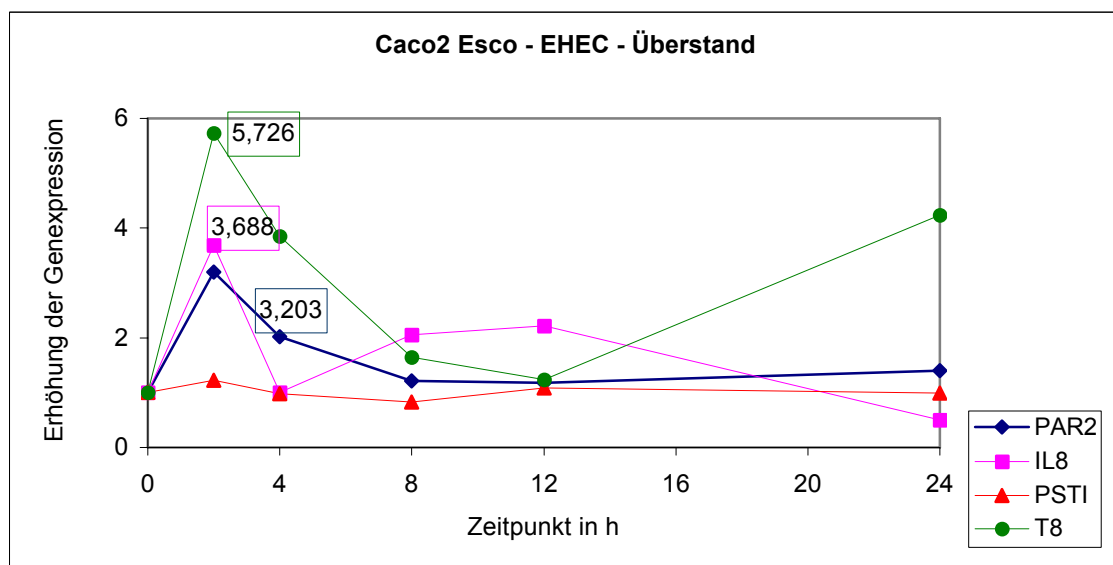
Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Der Überstand von *Escherichia coli* (EHEC 0157) führte zu einer biphasischen Regulation der IL8 Expression mit einem mäßigen Anstieg nach 2 Stunden auf das 3,7fache des Ausgangswertes, um nach 4 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum im Ausgangsniveau abzusinken. In der Folge stieg IL8 nach 12 Stunden auf das 2fache an, um im Verlauf von 24 Stunden auf das 0,5fache supprimiert zu werden. Die Expression von PAR2 wurde monophasisch reguliert und erreichte nach 2 Stunden ein Maximum von 3facher Expression, um nach 24 Stunden auf das Ausgangsniveau abzufallen. Die PSTI Expression wurde im Verlauf von 24 Stunden nicht signifikant verändert. T8 zeigte durch den Überstand von *Escherichia coli* (EHEC 0157) vermittelt, ebenfalls wie auch IL8, eine biphasische Regulation und erreichte nach 2 Stunden ein Maximum mit dem 6fachen der Grundexpression, um dann auf ein zwischenzeitliches Minimum im Niveau des Ausgangswertes abzufallen und im weiteren Verlauf nach 24 Stunden wieder auf das 4fache anzusteigen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

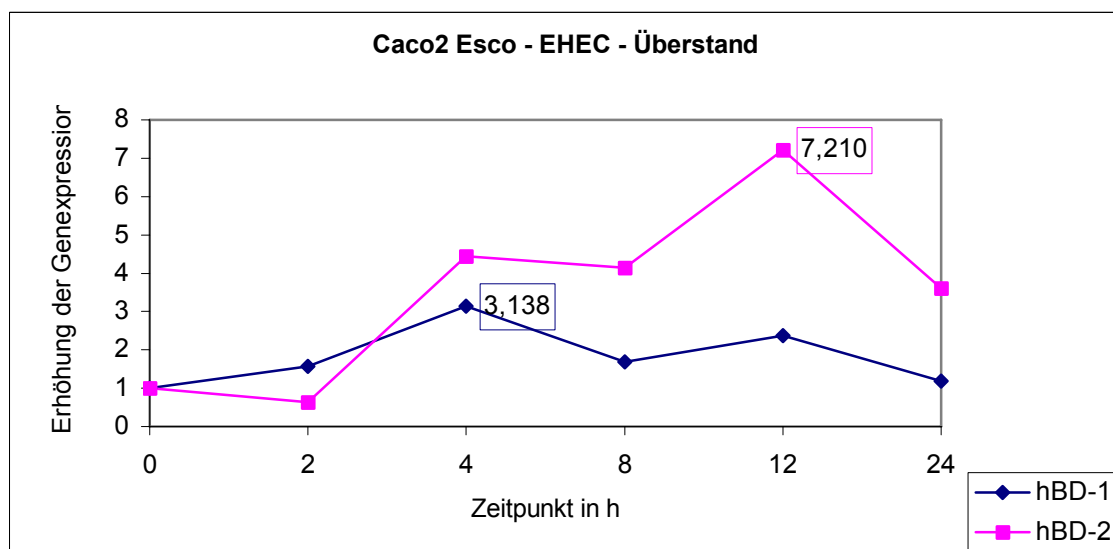
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Der Überstand von *Escherichia coli* (EHEC 0157) führte zu einer biphasischen Regulation der hBD-1 Expression mit einem raschen Anstieg nach 4 Stunden auf das 3fache des Ausgangswertes, um dann auf ein zwischenzeitliches Minimum von 1,7facher Expression abzufallen. Im weiteren Verlauf stieg die Expression wieder auf das 2,4fache an, um nach 24 Stunden wieder den Ausgangswert zu erreichen. Die Expression von hBD-2 zeigte nach initialer Suppression nach 2 Stunden auf das 0,7fache in der Folge eine monophasische Regulation mit einem Maximum nach 12 Stunden von 7facher Expression, um nachfolgend nach 24 Stunden auf das 3,6fache abzufallen.



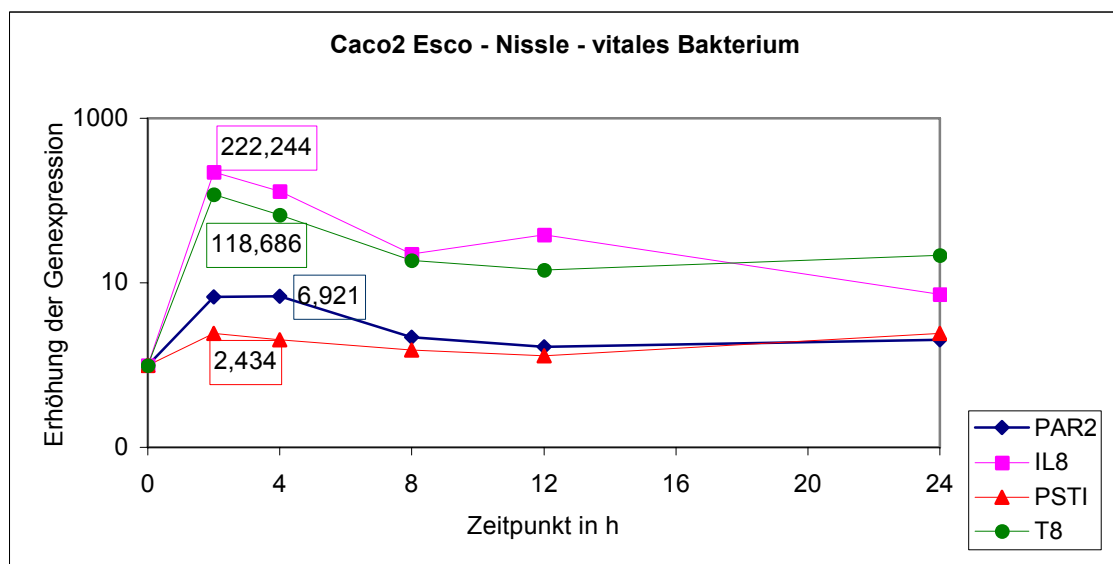
Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Das vitale Bakterium *Escherichia coli* (Nissle 1917) führte zu einer biphasischen Regulation der IL8 Expression mit einem raschen Anstieg nach 2 Stunden auf das 222fache des Ausgangswertes, um nach 8 Stunden ein zwischenzeitliches Minimum mit 23facher Steigerung zu erreichen und nach 12 Stunden wieder auf das 40fache anzusteigen. In der Folge fiel die Genexpression nach 24 Stunden wieder auf das 7fache ab. Die Expression von PAR2 zeigte eine ähnliche biphasische Regulation mit einem initialen Anstieg nach 2 Stunden auf das 7fach, einem zwischenzeitlichen Minimum nach 12 Stunden mit 1,7facher Expression und einem terminalen Anstieg nach 24 Stunden auf das 2fach des Ausgangswertes. Die PSTI Expression zeigte einen ähnlichen Verlauf mit einem schwachen Anstieg nach 2 Stunden auf das 2,4fache, einem nachfolgenden Abfall nach 12 Stunden auf das Ausgangsniveau und blieb im Verlauf von 24 Stunden noch 2fach gesteigert. T8 wurde wie IL8, PAR2 und PSTI biphasisch reguliert und erreichte nach 2 Stunden ein Maximum mit 119facher Genexpression, um dann nach 12 Stunden auf das 14fach abzusinken und im Verlauf von 24 Stunden wieder auf das 21fache abzustiegen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

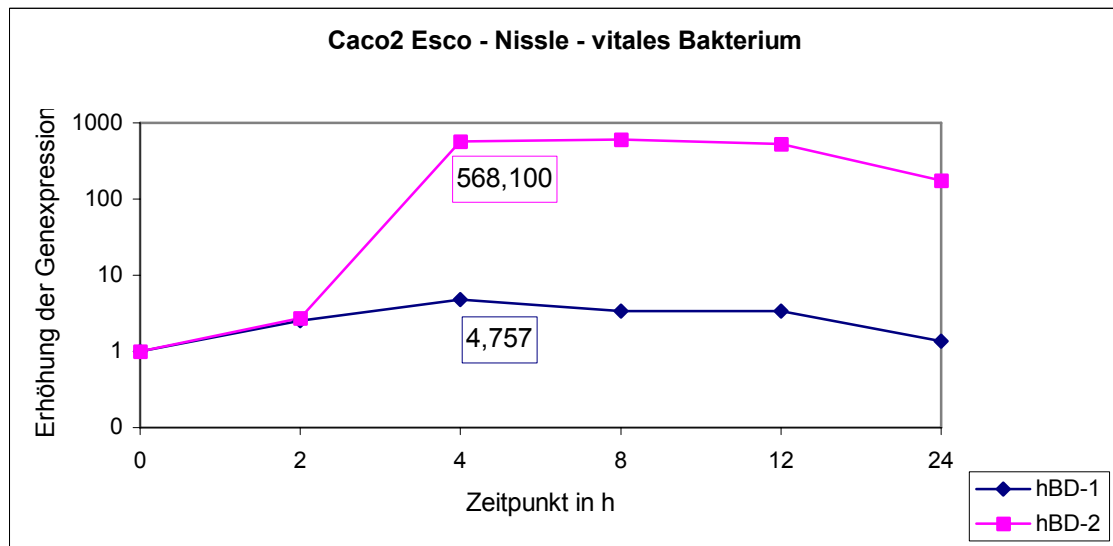
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Escherichia coli Nissle 1917 führte zu einer monophasischen Regulation der hBD-1 Expression mit einem raschen Anstieg nach 4 Stunden auf das 5fache des Ausgangswertes. Im weiteren Verlauf von 24 Stunden sank die Expression wieder auf das Ausgangsniveau ab. Die Expression von hBD-2 wurde ebenfalls monophasisch reguliert und erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 568facher Expression, um dann in der Folge leicht auf das 174fache abzufallen.



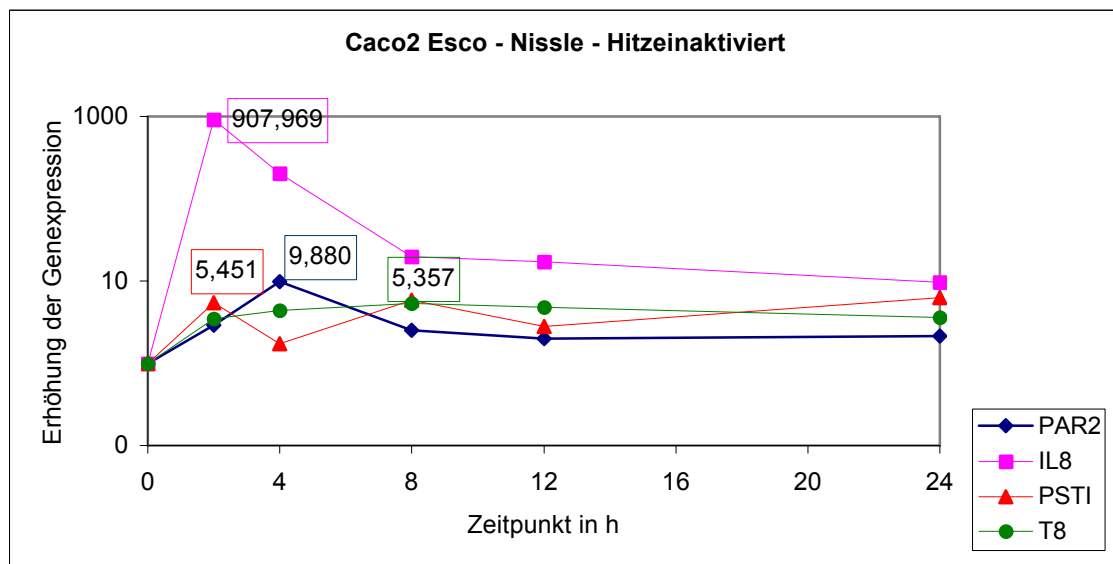
Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit 5×10^8 Bakterien / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Die hitzeinaktivierten Überreste von *Escherichia coli* Nissle 1917 führten zu einer monophasischen Regulation von IL8 mit einem raschen Anstieg nach 2 Stunden auf das 900fache, um nach 24 Stunden auf das 10fache abzufallen. Die PAR2 Expression wurde ebenfalls wie IL8 monophasisch reguliert und erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 10facher Expression, um sich nachfolgend wieder dem Ausgangsniveau anzunähern. Die Expression von PSTI wurde undulierend reguliert und zeigte nach 2 Stunden einen ersten Anstieg auf das 5,4fache, um dann auf ein zwischenzeitliches Minimum mit 1,7facher Expression abzufallen. In der Folge kam es nach 8 Stunden zu einem weiteren Anstieg auf das 5,4fach und nach 12 Stunden zu einem erneuten Abfall auf das 3fache des Ausgangswertes, um im Verlauf von 24 Stunden ein Maximum mit 6facher Expression zu erreichen. Die T8 Expression zeigte wie auch IL8 und PAR2 einen monophasischen Verlauf mit einem frühen Maximum von 10facher Genexpression, um nach 24 Stunden auf das 2fache abzufallen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

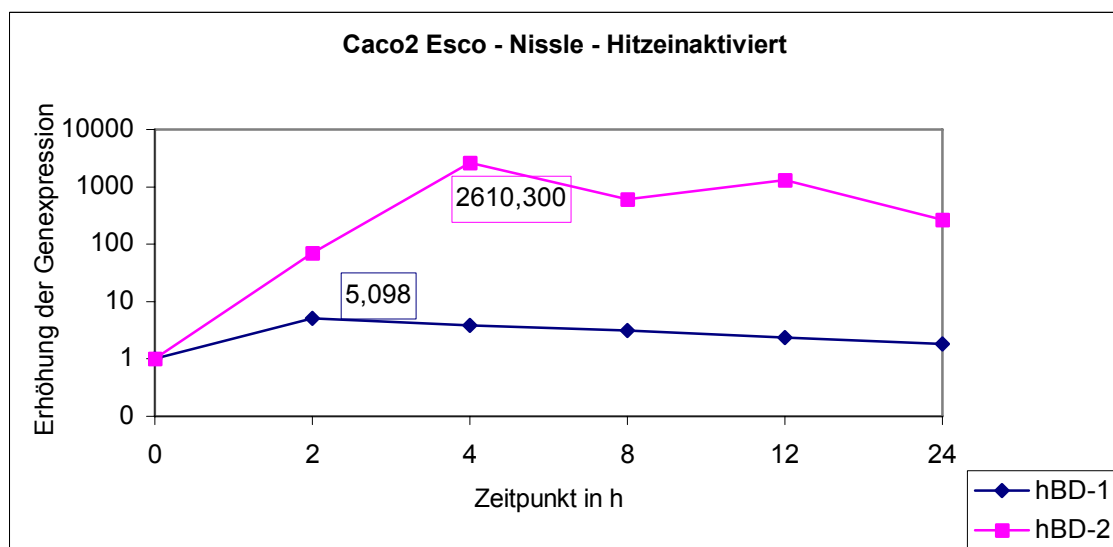
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Die hitzeinaktivierten Überreste von *Escherichia coli* Nissle 1917 führten zu einem raschen Anstieg der hBD-1 Expression nach 2 Stunden auf das 5fache des Ausgangswertes. In der Folge näherte sich die Expression nach 24 Stunden wieder dem Ausgangswert an. Die Genexpression von hBD-2 wurde biphasisch reguliert und erreichte nach 4 Stunden ein Maximum von 2610facher Expression, um dann nach 8 Stunden auf ein zwischenzeitliches Minimum von 600fach abzufallen. Im Verlauf stieg die Genexpression nach 12 Stunden erneut auf das 1300fache an, um nach 24 Stunden auf ein Minimum mit 265facher Expression abzusinken.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

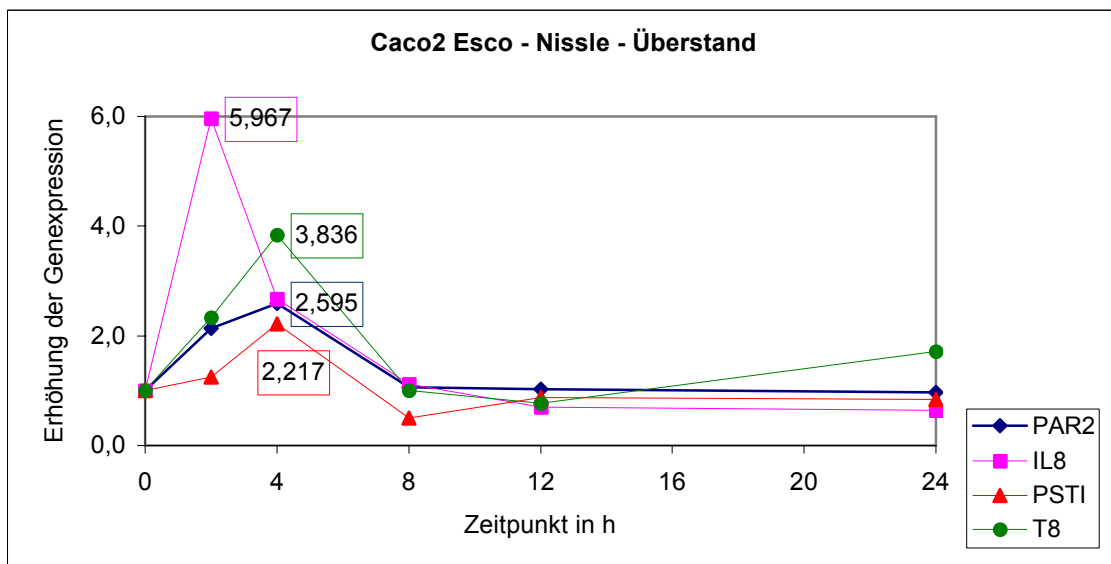
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – hitzeinaktiviert / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Der Überstand von *Escherichia coli* Nissle 1917 führte nach 2 Stunden zu einem raschen Anstieg der IL8 Expression auf das 6fache des Ausgangswertes, um nachfolgend innerhalb von 24 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau abzufallen. Die Expression von PAR2 wurde, wie auch IL8, monophasisch reguliert und stieg nach 4 Stunden auf ein Maximum mit 2,6facher Expression an. In der Folge fiel die Expression nach 24 Stunden wieder auf das Niveau des Ausgangswertes ab. PSTI zeigte einen biphasischen Verlauf mit einem frühen Maximum nach 4 Stunden mit 2facher Expression, einem zwischenzeitlichen Minimum nach 8 Stunden mit einer Suppression auf 0,5 und einem nachfolgenden Anstieg auf das Ausgangsniveau. Die T8 Expression wurde, wie auch PSTI, biphasisch reguliert und erreichte nach 4 Stunden ein Maximum mit 4facher Expression, um dann auf ein zwischenzeitliches Minimum von 0,7fach abzufallen und nach 24 Stunden erneut auf das 1,7fache anzusteigen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

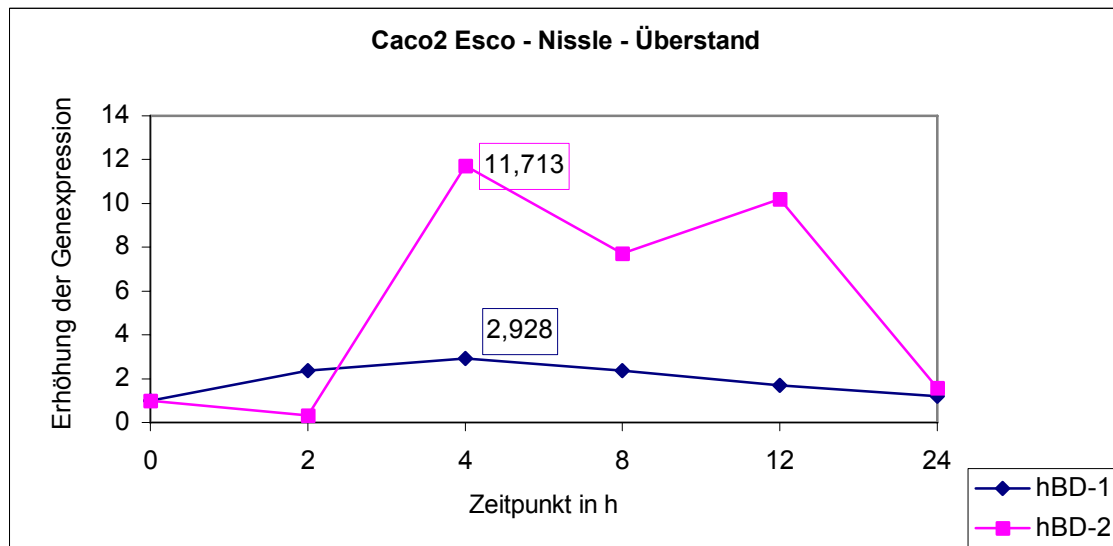
Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

Ergebnisse - Stimulation Caco2 mit Bakterien - Versuchsaufbau 2

Der Überstand von *Escherichia coli* Nissle 1917 führte zu einer monophasischen Regulation der hBD-1 Genexpression mit einem raschen Anstieg nach 4 Stunden auf das 3fache des Ausgangswertes, um nachfolgend wieder auf das Ausgangsniveau abzufallen. Die Genexpression von hBD-2 wurde biphasisch reguliert und erreichte nach 4 Stunden ein initiales Maximum mit 11facher Expression, um dann auf ein zwischenzeitliches Minimum von 8fach abzufallen. Im Verlauf stieg die Expression nach 12 Stunden erneut auf das 10fache an, um dann nach 24 Stunden auf 1,5 abzufallen.



Probenart: humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2

Probenanzahl: Aussaat 3-5d vor Stimulation 160000 Zellen/ Well einer 6-Well Platte,
n=3 je Gen

Stimulation: Start des Experimentes bei Subkonfluenz mit
 5×10^8 Bakterien – Überstand / Well

Methode: quantitative Real-Time-PCR, eingesetzte Probenmenge 5µl cDNA

3.2.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse - HT29 und Caco2 mit Bakterien 2

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse HT29 mit Bakterien 2:

Genexpression Bakterium	IL8		PAR2		PSTI		T8		hBD-1		hBD-2	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät	früh	spät	früh	spät	früh	spät
Escherichia coli enteropathogen ATCC 700790 <i>vital</i>	+++	+	++	0	++	0	++	+	+/-	+	+++	++
Escherichia coli enteropathogen ATCC 700790 <i>hitzeinaktiviert</i>	+++	+	+	0	--	--	+	0	--	0	+++	++
Escherichia coli enteropathogen ATCC 700790 <i>Überstand</i>	+++	-	+	+	+/-	--	+	0	--/+	0	++	++
Escherichia coli enterohämorrhagisch EHEC 0157 <i>vital</i>	++	+++	+	+	--	0	+	+	-	+	+++	++
Escherichia coli enterohämorrhagisch EHEC 0157 <i>hitzeinaktiviert</i>	+++	+	+	+	+	0	+	0	--	0	+++	+
Escherichia coli enterohämorrhagisch EHEC 0157 <i>Überstand</i>	++	+	+	+	+	0	+	0	-	+	++	++
Escherichia coli probiotisch Nissle 1917 <i>Vital</i>	+++	++	++	+	+	+	++	+	-	+	+++	++
Escherichia coli probiotisch Nissle 1917 <i>hitzeinaktiviert</i>	+++	+	+	+	++	+	+	+	-	+	+++	+++
Escherichia coli probiotisch Nissle 1917 <i>Überstand</i>	+++	+++	++	++	+	0	++	+	-	+	+++	+++
früh = bis 12 Stunden spät = bis 72 Stunden					>100 = +++ (hoch) >10 = ++ (mittelwertig) >1,5 = + (gering) +/- = 0 <0,75 = - <0,5 = --							

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse Caco2 mit Bakterien 2:

Genexpression Bakterium	IL8		PAR2		PSTI		T8		hBD-1		hBD-2	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät	früh	spät	früh	spät	früh	spät
Escherichia coli enteropathogen ATCC 700790 <i>vital</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++
Escherichia coli enteropathogen ATCC 700790 <i>hitzeinaktiviert</i>	+++	++	+	+	--	0	+	++	+	+	+++	+++
Escherichia coli enteropathogen ATCC 700790 <i>Überstand</i>	+	-	+	0	--	-	+	0	+	0	++	0
Escherichia coli enterohämorrhagisch EHEC 0157 <i>vital</i>	+	+++	+	0	+	--	+	+	++	+	++	++
Escherichia coli enterohämorrhagisch EHEC 0157 <i>hitzeinaktiviert</i>	+++	+	+	+	--	--	+	+	+	0	+++	+++
Escherichia coli enterohämorrhagisch EHEC 0157 <i>Überstand</i>	+	-	+	0	0	0	+	+	+	0	+	+
Escherichia coli probiotisch Nissle 1917 <i>Vital</i>	+++	+	+	+	+	+	+++	++	+	0	+++	+++
Escherichia coli probiotisch Nissle 1917 <i>hitzeinaktiviert</i>	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	0	+++	+++
Escherichia coli probiotisch Nissle 1917 <i>Überstand</i>	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	++	0
früh = bis 12 Stunden spät = bis 72 Stunden					>100 = +++ (hoch) >10 = ++ (mittelwertig) >1,5 = + (gering) +/- = 0 <0,75 = - <0,5 = --							

Das vitale Bakterium des pathogenen *Escherichia coli* Stammes (ATCC700790) führte bei HT29 in der Frühphase zu einer raschen und ausgeprägten (2h - 109fach), bei Caco2 zu einer geringen und verzögerten IL8 Induktion (8h – 7fach) sowie zu einer deutlichen jedoch etwas verzögerten PAR2 Induktion (HT29: 12h – 18fach; Caco2: 4h – 3fach). PSTI zeigte bei beiden Zelllinien eine Steigerung der Genexpression in der Frühphase (HT29: 2h – 2fach; Caco2: 4h – 10fach). T8 wurde bei HT29 und Caco2 in der Frühphase (HT29: 12h – 11fach; Caco2: 8h – 2fach) und in der Spätphase (HT29: 24h – 2fach; Caco2: 24h – 2fach) gesteigert exprimiert. Bei HT29 wurde hBD-1 in der Frühphase supprimiert (12h – 0,3fach). In der Spätphase erfolgte eine späte Induktion (24h – 8fach). Bei Caco2 hingegen wurde hBD-1 in der Frühphase nach 4 Stunden auf das 5fache gesteigert. In der Spätphase kam es zu keiner weiteren Regulation von hBD-1. Bei beiden Zelllinien zeigte die Expression von hBD-2 einen Anstieg in der Frühphase (HT29: 4h – 107fach; Caco2: 8h – 31fach) wie auch in der Spätphase (HT29: 24h – 39fach; Caco2: 24h – 14fach).

Nach dem Kontakt mit dem hitzeinaktivierten Bakterium *Escherichia coli* (ATCC700790) wurde das Maximum der IL8 Expression bei beiden Zelllinien in der Frühphase erreicht (HT29: 2h – 543fach; Caco2: 2h – 1904fach). In der Spätphase war die IL8 Expression gering erhöht. (HT29: 24h – 2fach; Caco2: 24h – 15fach). PAR2 wurde bei HT29 (2h – 3fach), wie auch bei Caco2 (2h – 8fach) in der Frühphase reguliert. PSTI wurde bei beiden Zelllinien im Verlauf der Messung supprimiert mit einem Minimum nach 8 Stunden (HT29: 0,5fach; Caco2: 0,4fach). T8 wurde bei HT29 und Caco2 in der Frühphase gesteigert (HT29: 2h – 6fach; Caco2: 2h – 9fach). Bei Caco2 erfolgte eine weitere Regulation von T8 in der Spätphase (24h – 15fach). hBD-1 wurde bei HT29 in der Frühphase supprimiert (4h – 0,3fach) und erreichte in der Spätphase wieder das Ausgangsniveau. Bei Caco2 zeigte sich in der Frühphase (2h – 4fach) sowie in der Spätphase (24h – 2fach) ein Anstieg der hBD-1 Genexpression. hBD-2 wurde bei beiden Zelllinien in der Früh- (HT29: 8h – 187fach; Caco2: 4h – 10441fach) sowie in der Spätphase (HT29: 24h – 19fach; Caco2: 24h – 374fach) gesteigert exprimiert.

Der Überstand des enteropathogenen *Escherichia coli* Stammes Nissle 1917 führte bei HT29 zu einer raschen Induktion der IL8 Expression (2h – 240fach) sowie bei Caco2 zu einer geringeren und verzögerten Expression (12h – 4fach). PAR2 wurde bei beiden Zelllinien in der Frühphase gesteigert exprimiert (HT29: 2h – 6fach; HT29: 4h – 3fach). PSTI wurde bei HT29 in der Frühphase (2h – 1,8fach) gesteigert und in der Spätphase (24h – 0,4fach) supprimiert, bei Caco im gesamten Verlauf supprimiert (Minimum 8h –

0,5fach). Die Expression von T8 wurde in der Frühphase bei HT29 und Caco2 gesteigert (HT29: 2h – 6fach; Caco2: 2h – 2fach) und erreichte in der Spätphase wieder das Ausgangsniveau. hBD-1 wurde bei HT29 in der Frühphase supprimiert (2h – 0,05fach) und in der Spätphase heraufreguliert (24h – 2fach). Bei Caco2 erfolgte ein gesteigerte Regulation ausschließlich in der Frühphase (4h – 4fach).

Das vitale Bakterium des enterohämorrhagischen *Escherichia coli* Stammes führte bei HT29 zu einer raschen und deutlichen Steigerung der IL8 Expression in der Früh- (4h – 65fach) und in der Spätphase (24h – 141fach). Bei Caco2 hingegen kam es in der Frühphase zu einem geringen Anstieg (4h – 3fach) und in der Spätphase zu einer deutlichen Steigerung (24h – 120fach). Die Genexpression von PAR2 wurde bei beiden in der Frühphase bei HT29 deutlich und bei Caco2 gering (HT29: 8h – 7fach; Caco2: 4h – 3fach) in der Spätphase bei HT29 mittelgradig (24h – 4fach) und bei Caco2 nicht reguliert. Die PSTI Genexpression wurde bei HT29 nur in der Frühphase supprimiert (4h – 0,4fach) in der Spätphase nicht beeinflusst. Bei Caco2 zeigte sich in der Frühphase ein Anstieg der PSTI Expression (2h – 3fach) und in der Spätphase eine deutliche Suppression (24h – 0,1fach). T8 zeigte bei beiden Zelllinien in der Frühphase (HT29: 4h – 8fach; Caco2: 4h – 3fach) sowie in der Spätphase (HT29: 24h – 4fach; Caco2: 24h – 2fach) eine Steigerung der Genexpression. hBD-1 wurde bei HT29 in der Frühphase supprimiert (8h – 0,5fach) und in der Spätphase erhöht exprimiert (24h – 2fach). Bei Caco2 wurde hBD-1 Expression in der Frühphase (2h – 10fach) sowie in der Spätphase (24h – 5h) gesteigert. hBD-2 wurde bei beiden Zelllinien in der Frühphase (HT29: 4h – 107fach; Caco2: 12h – 25fach) sowie in der Spätphase (HT29: 24h – 15fach; Caco2: 24h – 54fach) erhöht exprimiert.

Die hitzeinaktivierten Überreste von *Escherichia coli* EHEC 0157 führten bei beiden Zelllinien zu einem raschen Anstieg der IL8 Expression in der Früh- (HT29: 2h – 804fach; Caco2: 2h – 814fach) und in der Spätphase (HT29: 24h – 4fach; Caco2: 24h – 2fach). PAR2 zeigte, wie auch IL8, bei HT29 und Caco2 in beiden Phasen eine erhöhte Expression (HT29: 4h – 9fach, 24h – 4fach; Caco2: 4h – 5fach, 24h – 2fach). Die Expression von PSTI wurde bei HT29 in der Frühphase gesteigert (8h – 4fach) in der Spätphase nicht reguliert. Bei Caco2 erfolgte, nach Kontakt mit dem hitzeinaktivierten Bakterium *Escherichia coli* EHEC 0157, eine generelle Suppression über den gesamten Untersuchungszeitraum (2h – 0,1fach). Die T8 Expression wurde ähnlich wie PAR2 und IL8 reguliert und zeigte ein frühes Maximum (HT29: 4h – 5fach; Caco2: 4h – 8fach) und bei Caco2 noch einen weiteren Anstieg in der Spätphase (24h – 3,8fach). hBD-1 wurde bei HT29 während des gemessenen 24 Stunden Zeitraumes supprimiert

(8h- 0,5fach), bei Caco2 in der Frühphase gesteigert exprimiert (8h – 3fach). Die Expression von hBD-2 wurde bei beiden Zelllinien in der Früh- (HT29: 4h – 163fach, Caco2: 12h – 1846fach) wie auch in der Spätphase (HT29: 24h – 3fach; Caco2: 24h – 431fach) erhöht.

Der Überstand von Escherichia coli EHEC 0157 führte zu einem mäßigen Anstieg der IL8 Expression bei beiden Zelllinien in der Frühphase (HT29: 2h – 53fach; Caco2: 2h – 4fach) und bei HT29 in der Spätphase (24h – 4fach) sowie bei Caco2 in der Spätphase zu einer Suppression (24h – 0,5fach). Die Expression von PAR2 wurde bei beiden Zelllinien in der Frühphase induziert (HT29: 12h – 4fach; Caco2: 2h – 3fach). In der Spätphase war PAR2 nur bei HT29 gesteigert (24h – 2fach), bei Caco2 bewegte sich PAR2 auf dem Ausgangsniveau.

Die PSTI Expression wurde bei HT29 nur in der Frühphase (2h – 6fach), bei Caco2 im gesamten Beobachtungszeitraum nicht reguliert. T8 zeigte bei HT29 eine monophasische (2h – 4fach) bei Caco2 eine biphasische (2h – 6fach, 24h – 4fach) Regulation. hBD-1 zeigte bei HT29 im Verlauf von 24 Stunden in der Frühphase eine Suppression (8h – 0,5fach) und in der Spätphase einen Anstieg der Genexpression (24h – 2fach). hBD-2 wurde bei HT29 und Caco2 in der Früh- (HT29: 4h – 87fach; Caco2: 12h – 7fach) wie auch in der Spätphase (HT29: 24h – 14fach; Caco2: 24h – 4fach) heraufreguliert.

Das vitale Bakterium Escherichia coli Nissle 1917 führte zu einer raschen und deutlichen Induktion der IL8 Expression in der Früh- (HT29: 2h – 859fach; Caco2: 2h – 222fach) wie auch in der Spätphase (HT29: 24h – 46fach; Caco2: 24h – 7fach) beider Zelllinien. Die Expression von PAR2 wurde ebenfalls, wie auch IL8, in der Früh- (HT29: 4h – 11fach; Caco2: 4h – 7fach) wie auch in der Spätphase (HT29: 24h – 13fach; Caco2: 24h – 7fach) gesteigert. Ebenso wurde die Expression von PSTI beeinflusst. In der Frühphase und in der Spätphase zeigte sich bei HT29 (2h/ 24h – 2fach) und Caco2 (2h + 24 – 2fach) eine mäßige Erhöhung der Genexpression. T8 wurde, wie auch IL8 und PAR2, durch Escherichia coli Nissle 1917 gesteigert exprimiert. Dabei zeigte sich ein Maximum in der Frühphase nach 2 Stunden (HT29: 2h – 13fach; Caco2: 2h – 119fach) und in der Spätphase (HT29: 24h – 3,5fach; Caco2: 24h – 21fach). Die Genexpression von hBD-1 wurde in der Frühphase bei HT29 supprimiert (12h – 0,6fach), bei Caco2 erhöht (4h – 5fach) und in der Spätphase bei HT29 gesteigert (24h – 2fach) und bei Caco2 wieder auf den Ausgangswert abgesenkt. hBD-2 wurde bei beiden Zelllinien in der Früh- (HT29: 4h – 265fach; Caco2: 4h – 568fach) wie auch in der Spätphase (HT29: 24h – 23fach; Caco2: 24h – 174fach) angehoben.

Das hitzeinaktivierte Bakterium *Escherichia coli* Nissle 1917 führte zu einem raschen und starken Anstieg der IL8 Expression in beiden Zelllinien, wobei die absolute Höhe bei HT29 (2h – 696fach) geringer ausgeprägt war als bei Caco2 (2h – 908fach). In der Spätphase blieb die Expression bei HT29 (24h – 3fach) und Caco2 (24h – 10fach) erhöht. Die Expression von PAR2 wurde bei HT29 (8h – 4fach) und Caco2 (4h – 10fach) in der Frühphase gesteigert. In der Spätphase war bei beiden Zelllinien noch eine geringe Steigerung messbar (HT29: 24h – 2fach; Caco2: 24h – 2fach). Die PSTI Expression zeigte bei beiden Zelllinien in der Früh- (HT29: 2h – 49fach; Caco2: 2h – 5fach) und in der Spätphase (HT29: 24h – 1,5fach; Caco2: 24h – 6fach) einen geringen Anstieg der Genexpression. Die Infektion mit den hitzeinaktivierten Bakterien des Stammes *Escherichia coli* Nissle 1917 führte zu einem Anstieg der T8 Expression in der Frühphase (HT29: 4h – 3fach; Caco2: 8h – 5fach). In der Spätphase war die T8 Expression weiterhin gering erhöht (HT29: 24h – 1,5fach; Caco2: 24h – 4fach). Die Expression von hBD-1 wurde in der Frühphase bei HT29 supprimiert (8h – 0,6fach) bei Caco2 gesteigert (2h – 5fach) in der Spätphase bei HT29 erhöht (24h – 5fach) und bei Caco2 auf das Ausgangsniveau reduziert. Die hBD-2 Expression zeigte bei beiden Zelllinien eine Steigerung in der Frühphase (HT29: 8h – 1060fach; Caco2: 4h – 2610fach) und blieb bei HT29 (24h – 187fach) und Caco2 (24h – 265fach) erhöht.

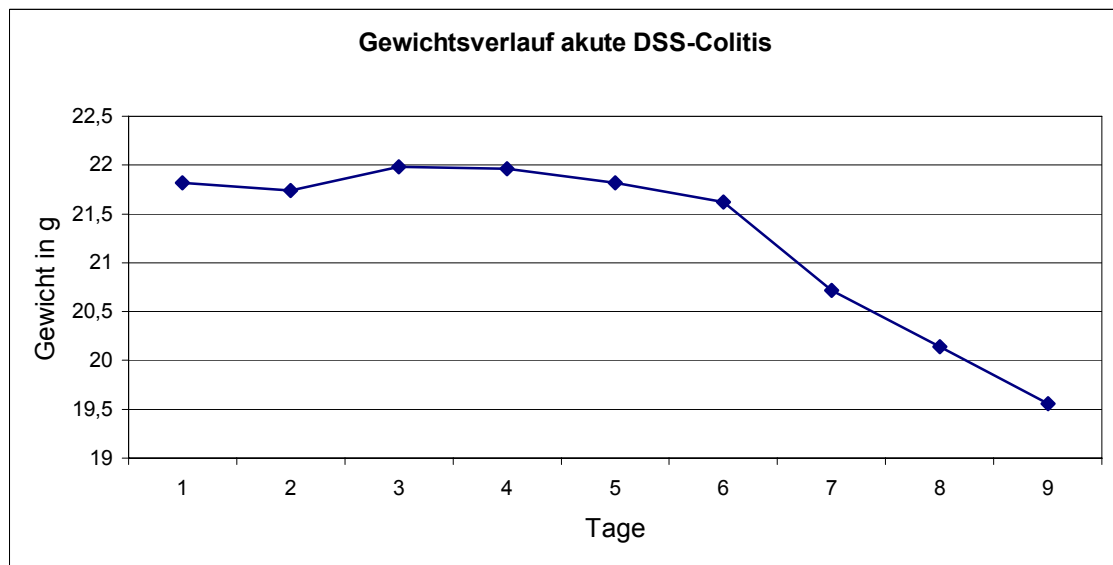
Der Überstand des Bakterium Stammes *Escherichia coli* Nissle 1917 führte zu einem Anstieg der IL8 Expression in der Frühphase (HT29: 2h – 455fach; Caco2: 2h – 6fach). In der Spätphase blieb die Expression bei HT29 weiterhin erhöht (24h – 46fach) bei Caco2 wurde wieder das Ausgangsniveau erreicht. Die Expression von PAR2 zeigte bei HT29 eine deutliche (4h – 25fach) und bei Caco2 eine mäßige (4h – 3fach) Steigerung in der Frühphase. In der Spätphase blieb die Expression bei HT29 erhöht (24h – 8fach), während sie bei Caco2 wieder auf das Ausgangsniveau zurückging. PSTI zeigte bei beiden Zelllinien einen Anstieg der Expression in der Frühphase (HT29: 4h – 3fach; Caco2: 4h – 2fach) und eine Normalisierung des Niveaus in der Spätphase auf den Ausgangswert. Die T8 Expression stieg ebenfalls bei beiden Zelllinien in der Frühphase (HT29: 8h – 15fach; Caco2: 4h – 4fach) an und blieb nach 24 Stunden erhöht (HT29: 24h – 3fach; Caco2: 24h – 2fach). Die Expression von hBD-1 erreichte in der Frühphase bei HT29 ein Minimum (8h – 0,5fach) bei Caco2 ein Maximum (4h – 3fach) und in der Spätphase stieg die Expression bei HT29 (24h – 4fach) an, bei Caco2 erreichte sie wieder das Ausgangsniveau. hBD-2 wurde bei beiden Zelllinien in der Frühphase gesteigert (HT29: 8h – 1217fach; Caco2: 4h 12fach) und blieb bei HT29

erhöht (24h – 81fach), während die Expression bei Caco2 wieder auf das Ausgangsniveau abfiel.

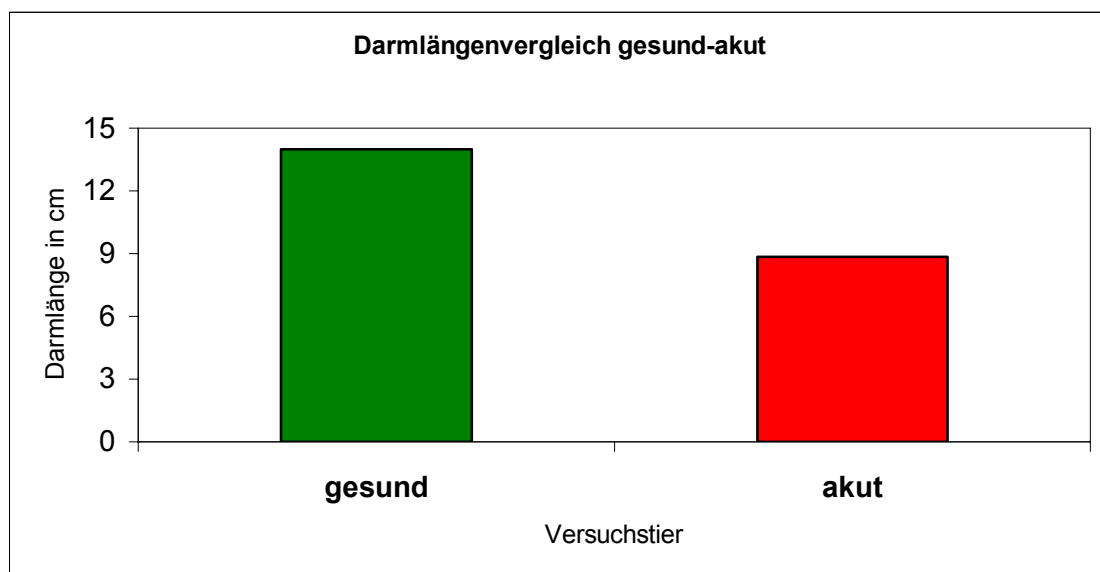
3.3. DSS–Kollitis–Maus–Modell

Nachdem in verschiedenen Modellen das Verhalten von PAR2 in vitro bei akuten Entzündungen untersucht wurde, sollte in der Folge die Unterschiede der Expression von PAR2 und PAR2 beeinflussenden Genen in vivo im Tiermodell näher untersucht werden. Wie schon zuvor im Methodikteil beschrieben wurde bei weiblichen Mäusen der Spezies Balb/c mit einem Ausgangsgewicht von mindestens 20g mittels im Trinkwasser befindlichem DSS (Dextran Sulfat Sodium Salt, ICN Biomedicals ⁽¹⁴⁾, Art.Nr.160110) eine chemische Kollitis induziert. Im akuten Modell erhielten die Tiere täglich, im chronischen über 7 Tage in 4 Zyklen alle 10 Tage die 3% bzw. 2% DSS-Lösung. Die Chronifizierung trat bei den Tieren ca. 4 Wochen nach dem 4. Zyklus ein und blieb für ca. 8 Wochen erhalten. Deutlich war die Erkrankung am Allgemeinzustand der Tiere (Vigilanz, Gewicht) und an der Verkürzung der erkrankten Därme zu erkennen. In den folgenden Abbildungen wird dies gezeigt.

Der Gewichtsverlust der Versuchstiere mit akuter chemischer Kolitis war am deutlichsten nach 6 Tagen zu erkennen. Die Tiere verloren im Mittel nach 9 Tagen ca. 3g ihres Körpergewichtes. Dies entspricht einem Gewichtsverlust von ca. 15%-20% nach 9 Tagen. Wie schon angedeutet zeigen die Tiere im chronischen DSS-Kolitis-Modell keine Gewichtsveränderungen (Abb. Dunger, N., Uni Regensburg).

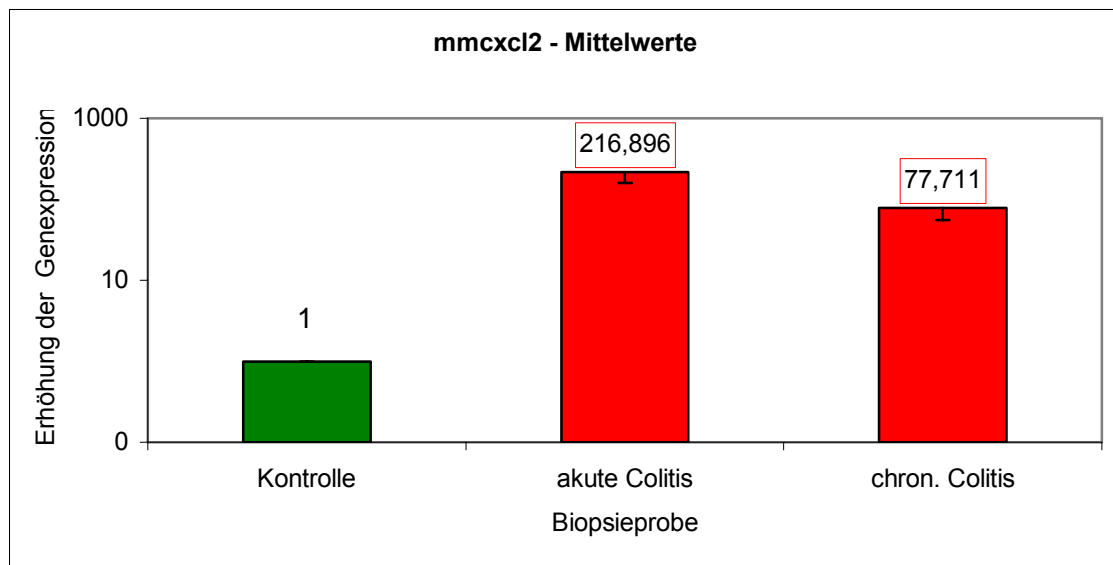


Im Vergleich der Darmlängen von Tieren mit akuter chemischer Kolitis und den gesunden Kontroll-Tieren fielen die deutlich verkürzten Därme der DSS-Kolitis-Mäuse auf (Abb.3.4.2. Dunger, N., Uni Regensburg)



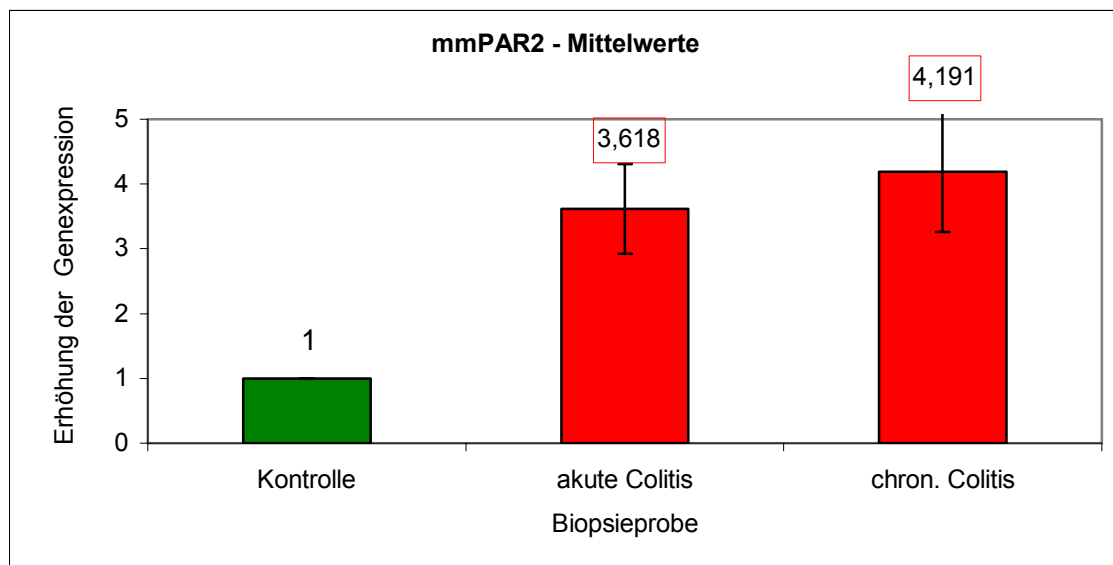
n=10 Tiere

Die Ergebnisse der Regulation von mmCxcl2 zeigten einen Anstieg der mmCxcl2 Expression bei der akuten DSS-Kolitis. Geringer, aber deutlich höher als bei den gesunden Kontrolltieren, war die mmCxcl2 Expression bei den Tieren mit chronischer Kolitis ausgeprägt. Die Steigerung der mmCxcl2 Expression betrug bei Tieren mit akuter Kolitis das 217fache und bei Tieren mit chronischer Kolitis das 78fache des Normwertes der Tiere der gesunden Kontrollgruppe.



n=10 Tiere, Methode: quantitative Real-Time-PCR

PAR2 war bei den Mäusen mit chronischer Kolitis höher exprimiert, als bei den Mäusen mit akuter Kolitis. Beide Formen der Kolitis wiesen einen deutlichen Anstieg der Expressionsrate von PAR2 auf. Bei den Tieren mit akuter Kolitis war die Expression von PAR2 auf das 3,6fache, bei Tieren mit chronischer Kolitis auf das 4,2fache gesteigert.



n=10 Tiere, Methode: quantitative Real-Time-PCR

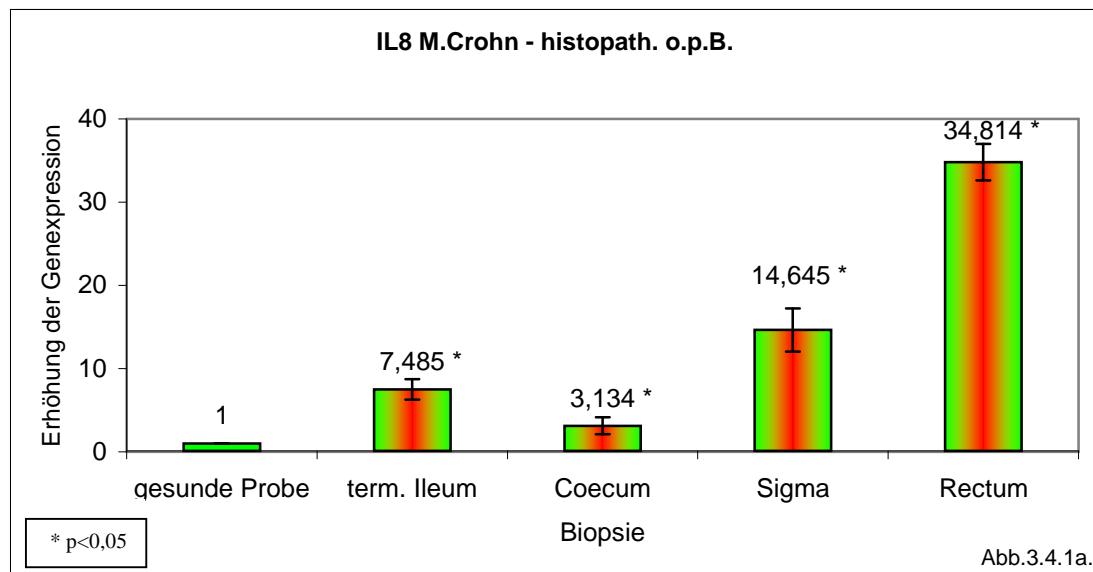
3.4. Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa

Nachdem die Expression von IL8, PAR2, PSTI und T8 in vivo im DSS-Modell der Maus untersucht wurde, stellte sich die Frage der Vergleichbarkeit bzw. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf chronische Darmerkrankungen des Menschen wie M. Crohn und Colitis ulcerosa. Deshalb wurden Schleimhautproben einer Kontrollgruppe mit gesundem Darm (grüner Balken) mit solchen von an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie M. Crohn bzw. Colitis ulcerosa Erkrankten verglichen. Nach der Gewinnung der Epithelzellen erfolgte die Isolierung der RNA und die Messung der o.g. Gene mittels quantitativer Real-Time-PCR.

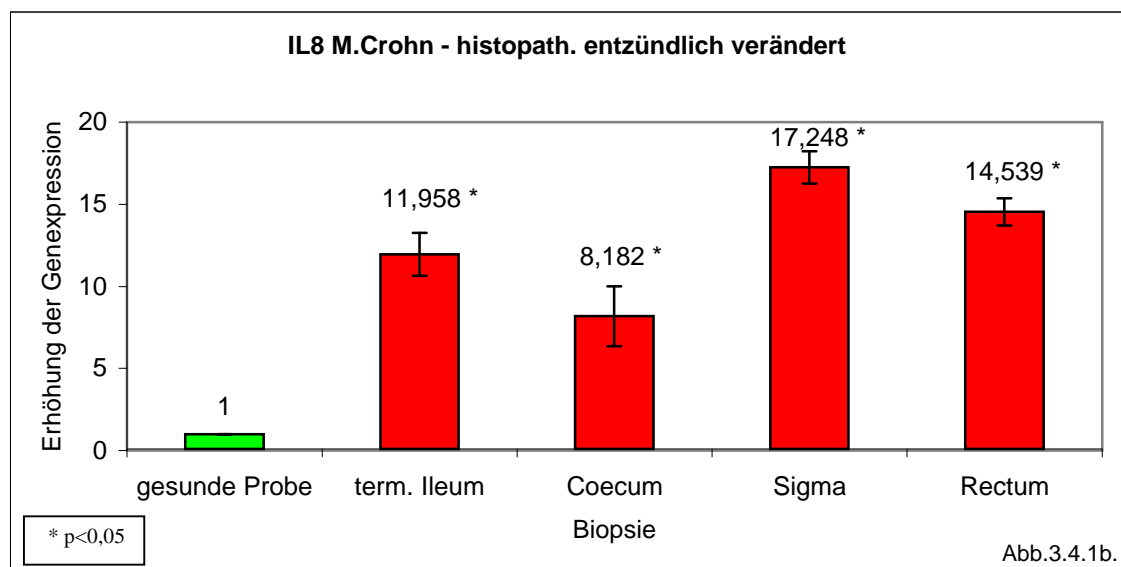
Die Gewebeproben von den Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa wurden weiter, entsprechend dem histopathologischen Befund, differenziert. Proben die histopathologisch eine Entzündung zeigten, wurden in den folgenden Diagrammen mit rotem Balken, Proben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die histopathologisch einen Normalbefund aufwiesen, wurden mit einem rot-grünen Balken dargestellt. Statistisch signifikante Werte ($p < 0,05$) wurden mittels Sternchen (*) gekennzeichnet. In den Diagrammen wurde die Expression von IL8, PAR2, PSTI und T8 in den Schleimhautproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa gezeigt.

3.4.1. Gewebeproben von M. Crohn Patienten

Die statistisch signifikante Steigerung der IL8 Expression ($p < 0,05$) ließ sich bei den entzündeten Proben (Abb.3.4.1b.) im terminalen Ileum (12fach), im Caecum (8fach) und im Sigma (17fach) nachweisen. Bei den nicht entzündeten Proben (Abb.3.4.1a.) war IL8 gesteigert, lag jedoch unter der Expression der entzündeten Proben (terminales Ileum 7,5fach, Caecum 3,1fach, Sigma 14,6fach). Auffällig war eine veränderte IL8 Expression im Rectum, die bei den nicht entzündlichen Proben (Abb.3.4.1a.) 34,8fach und bei den entzündeten Proben (Abb.3.4.1b.) 14,5fach gesteigert war.

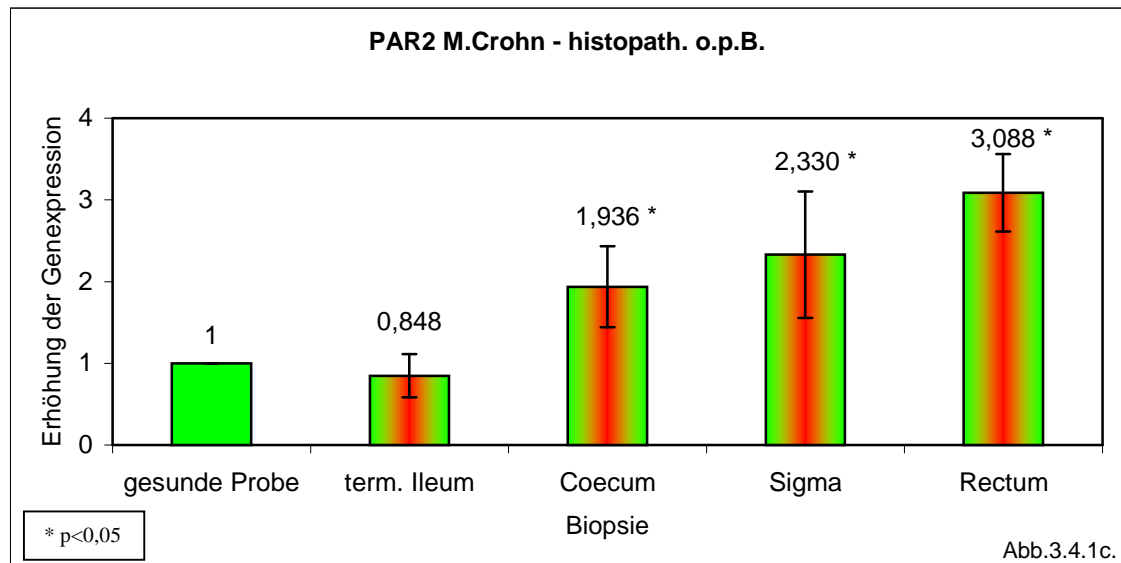


Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: term. Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

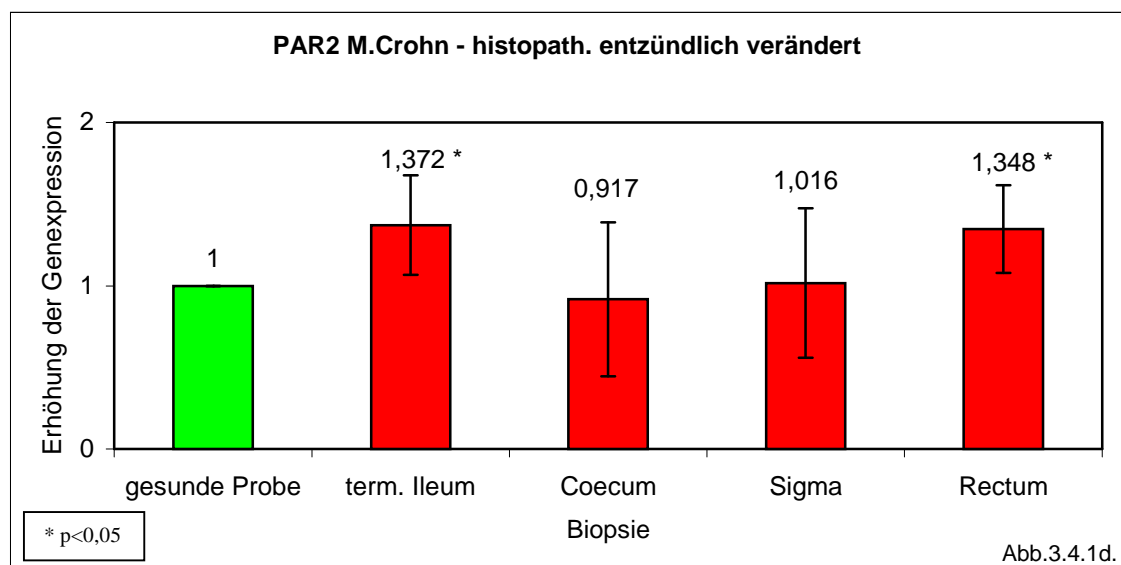


Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10

Im Vergleich von entzündlich veränderten M. Crohn-Proben (Abb.3.4.1d.) und nicht entzündlich veränderten (Abb.3.4.1c.) zeigte sich eine gering verringerte PAR2 Expression (0,8fach) im Bereich des terminalen Ileums bei den nicht entzündeten Proben, während bei den entzündeten Proben kaum eine Veränderung der PAR2 Aktivität vorlag (0,9- bis 1,3fach). Bei den restlichen nicht entzündeten Proben ließ sich eine Steigerung der PAR2 Aktivität bis auf das 3,1fache nachweisen.

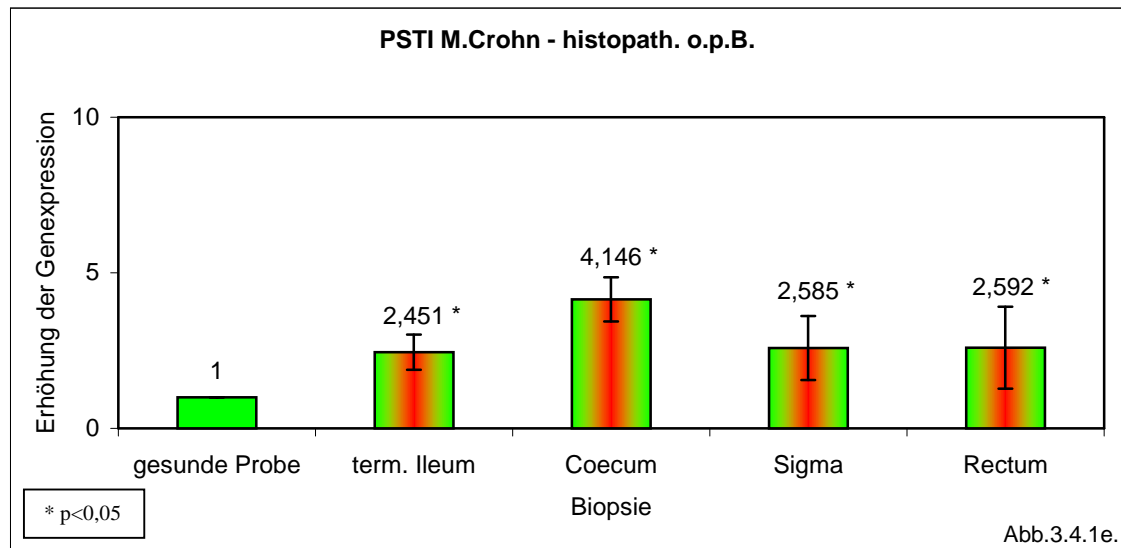


Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

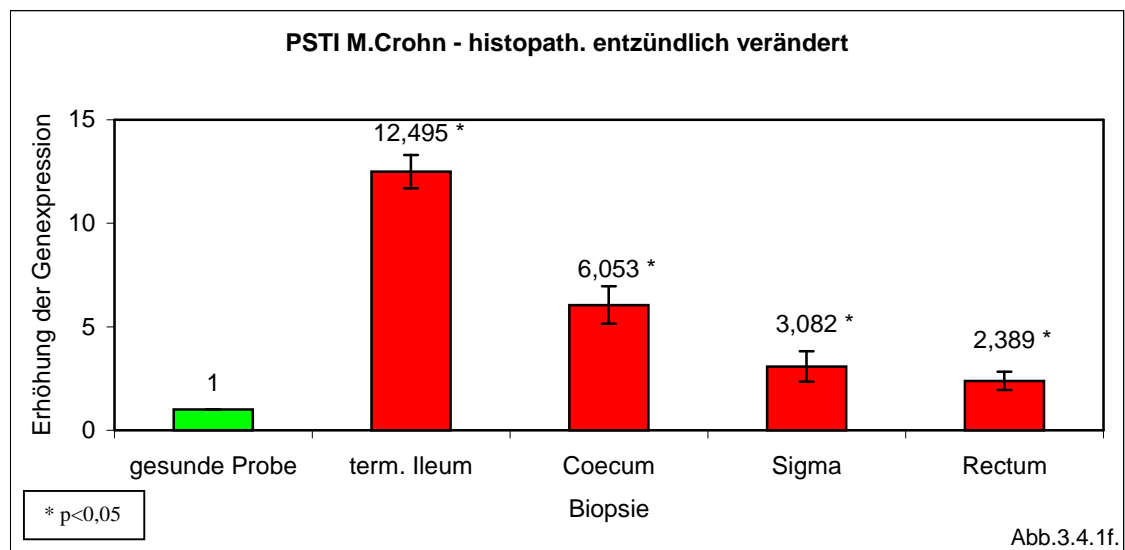


Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Die entzündlich veränderten Patienten-Proben (Abb.3.4.1f.) zeigten eine Steigerung der PSTI Expression im terminalen Ileum (12,5fach), Caecum (6fach) und Sigma (3fach) und im Rectum (2fach). Bei den M. Crohn Patienten-Proben, bei denen sich histologisch keine Entzündungsaktivität nachweisen ließ (Abb.3.4.1e.), war die Genexpression deutlich geringer erhöht (terminales Ileum (2fach), Caecum (4fach), Sigma (2,6fach), Rectum (2,5fach)), als bei den entzündlich veränderten Proben.

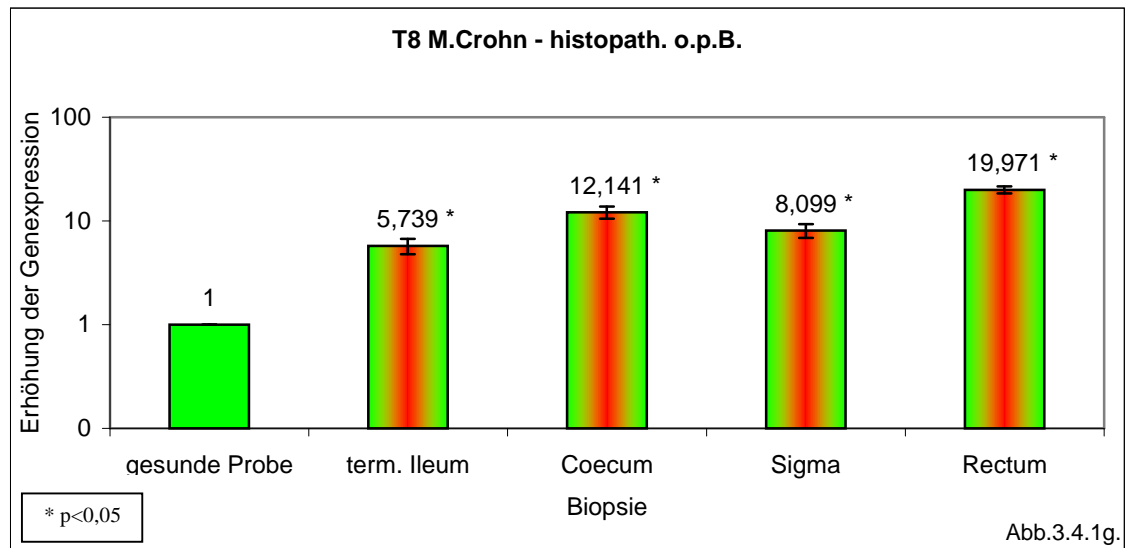


Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

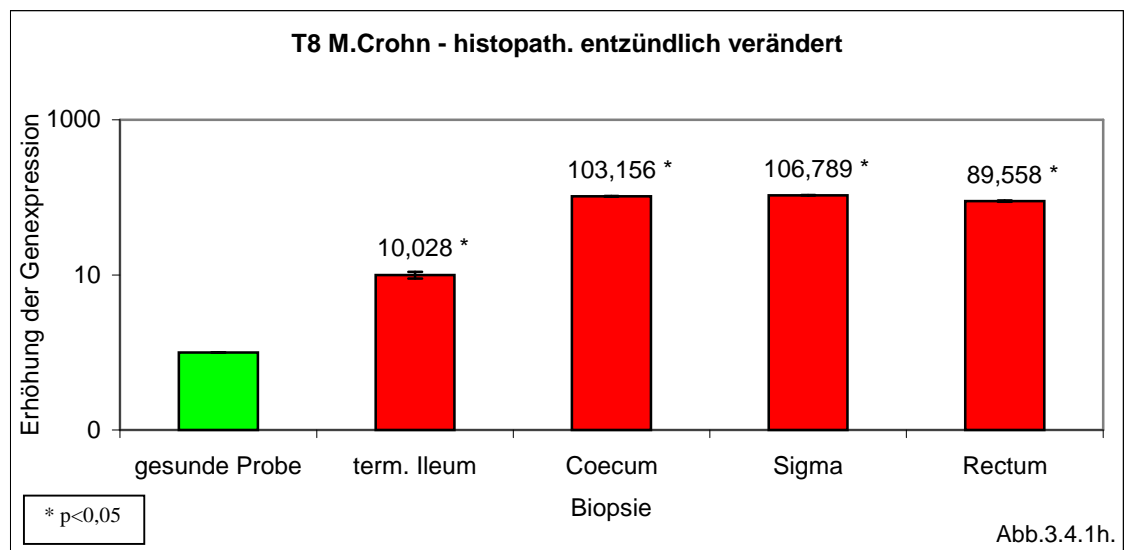


Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Die Genexpression von T8 war bei den akut entzündeten Proben (Abb.3.4.1h.) in Bezug zur gesunden Kontrollgruppe im term. Ileum (10fach), im Coecum (103fach), im Sigma (106fach) und im Rectum (90fach) deutlich gesteigert. Bei den nicht entzündlich veränderten Patienten Proben (Abb.3.4.1g.) fiel die Steigerung der Genexpression im term. Ileum (5fach), im Coecum (12fach), im Sigma (8fach) und im Rectum (20fach) insgesamt geringer, jedoch dennoch erhöht aus.



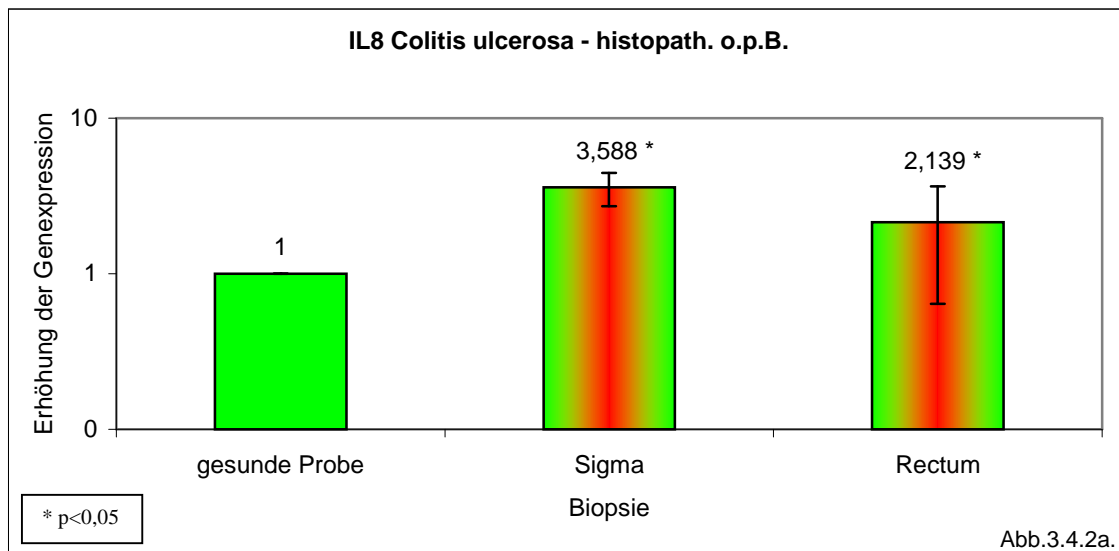
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-nicht entzündet: term. Ileum:10, Coecum:10, Sigma:8, Rectum:6
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



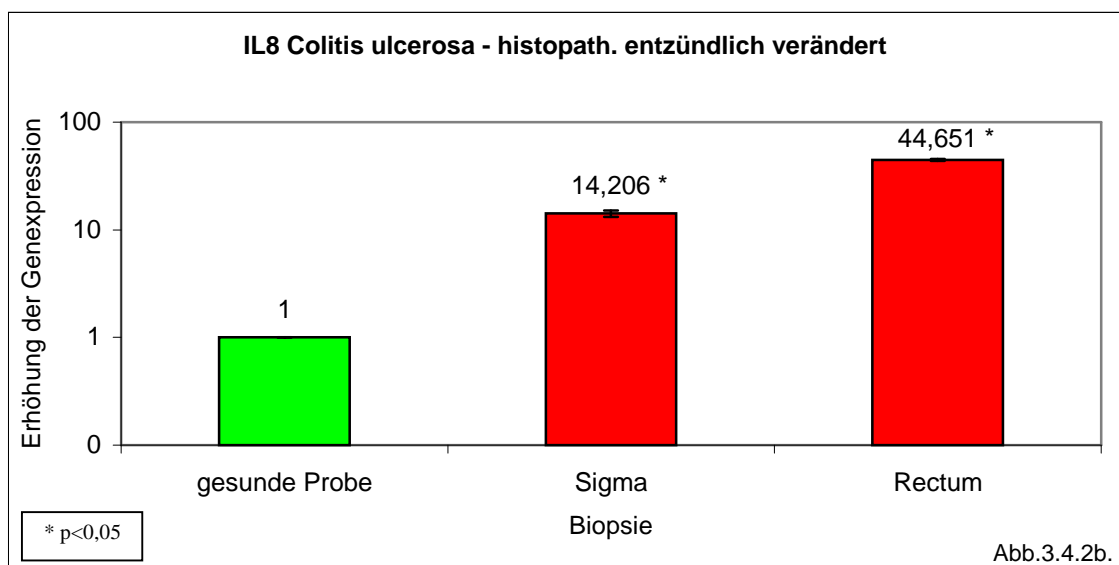
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: M. Crohn
 Probenanzahl: n-krank-entzündet: term. Ileum:11, Coecum:8, Sigma:10, Rectum:11
 n-gesund: Ileum:11, Coecum:11, Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

3.4.2. Gewebeproben von Colitis ulcerosa Patienten

Für die IL8 Expression in den entzündeten Colitis-Proben (Abb.3.4.2b.) ließ sich im Sigma bzw. Rectum eine Induktion der Genexpression mit 14- bzw. 44facher Erhöhung nachweisen. In den nicht entzündeten Colitis-Proben (Abb.3.4.2a.) konnte eine 3,6fache Steigerung im Sigma und eine 2,1fache Steigerung im Rectum gezeigt werden.

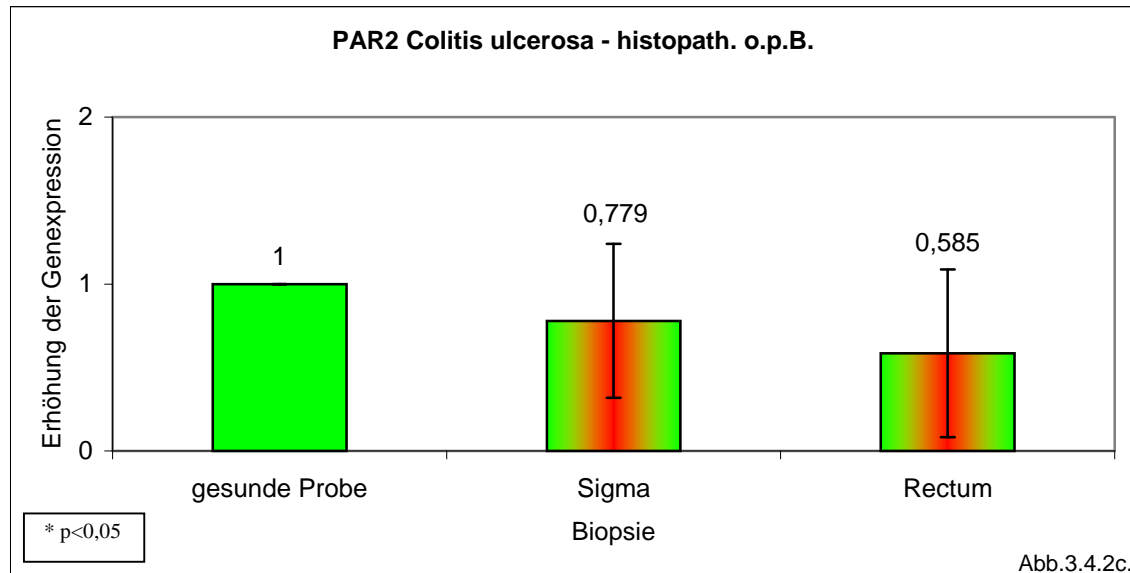


Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
 Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
 n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

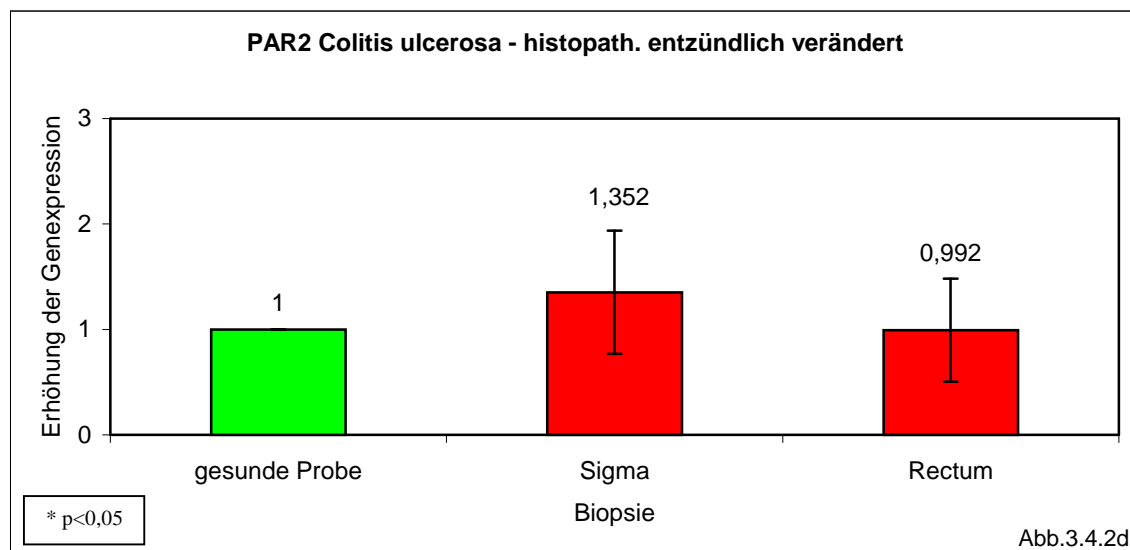


Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
 Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma (S): 12, Rectum(R): 12
 n-gesund: (S):11, (R):10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Bei den entzündlich veränderten Colitis-Proben (Abb.3.4.2d.) zeigte sich eine geringe statistisch nicht signifikante Supression von PAR2 im Sigma und Rectum auf das 0,8- bzw. 0,6fache. In den nicht entzündeten Colitis-Proben (Abb.3.4.2c.) war PAR2 im Sigma auf das 1,3- und im Rectum nicht gesteigert.



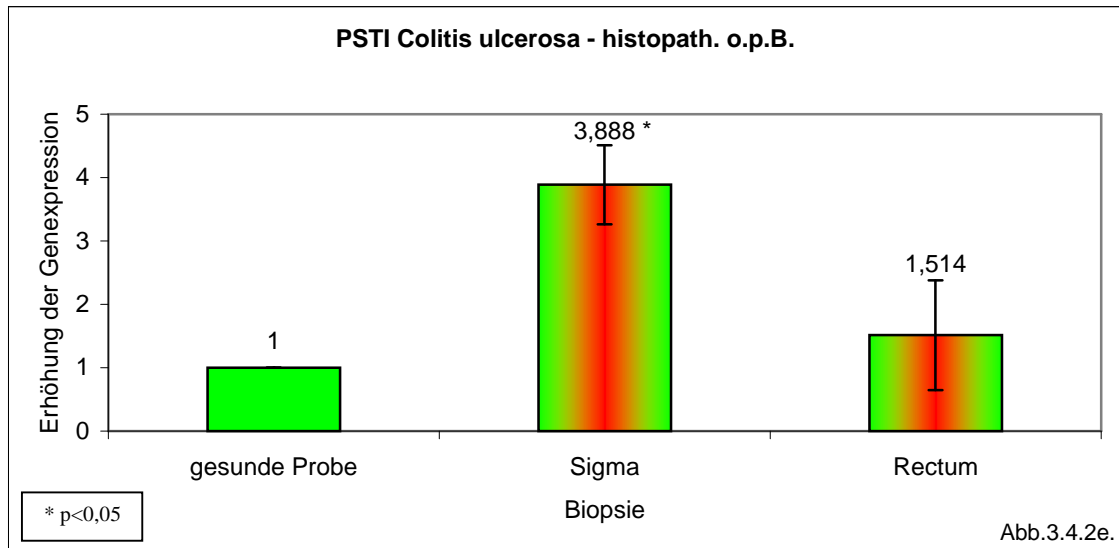
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
 Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
 n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



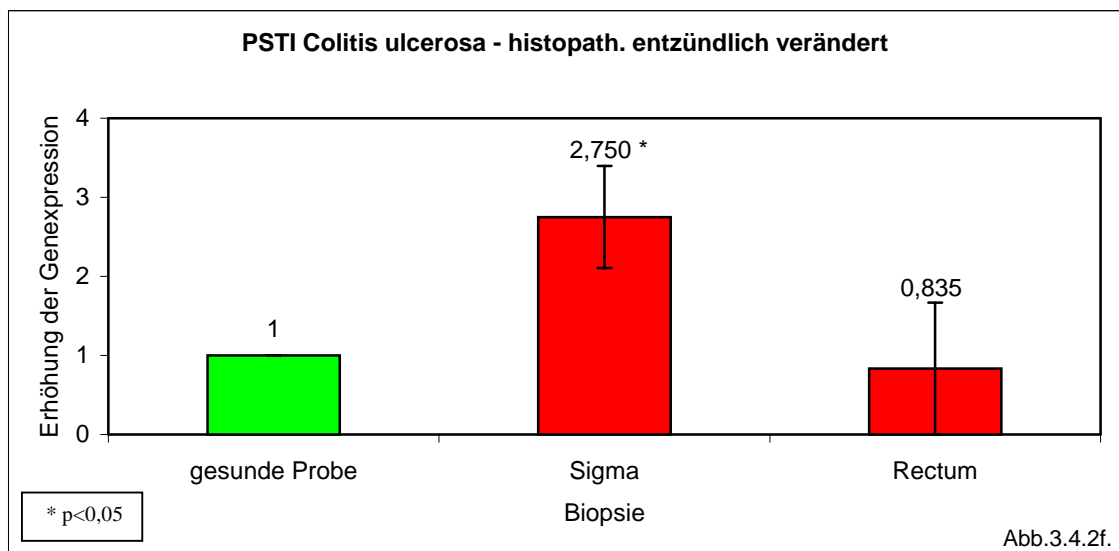
Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
 Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma:12, Rectum:12
 n-gesund Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

Ergebnisse - Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa

Bei den histologisch nicht entzündeten Colitis ulcerosa Proben (Abb.3.4.2e.) war die PSTI Genexpression im Sigma auf das 3,9fache und im Rectum auf das 1,5fache erhöht. Die histologisch nachgewiesen entzündlich veränderten Proben (Abb.3.4.2f.) zeigten einen Anstieg der PSTI Genexpression im Sigma auf das 2,8fache und im Rectum eine Suppression auf das 0,8fache.

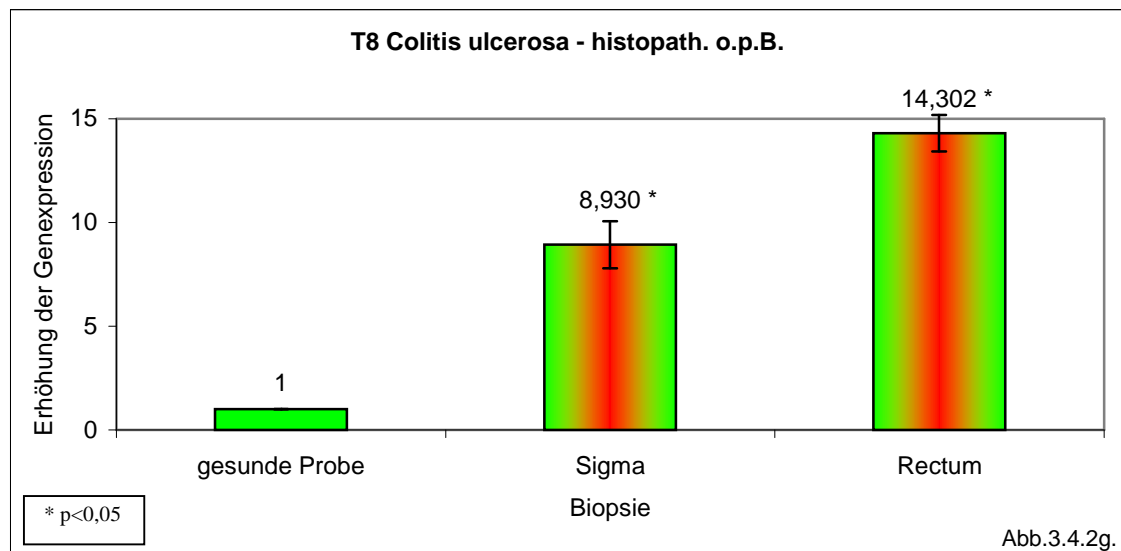


Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
Methode: quantitative Real-Time-PCR

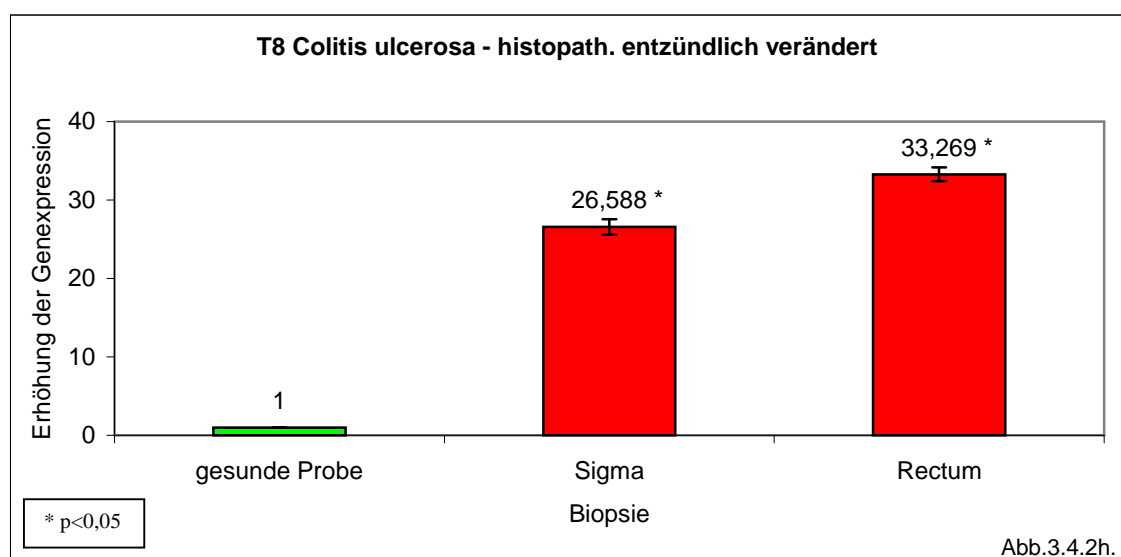


Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma:12, Rectum:12
n-gesund: Sigma:11, Rectum:10
Methode: quantitative Real-Time-PCR

Für die T8 Expression fand sich bei den nicht entzündeten Colitis ulcerosa Proben (Abb.3.4.2g.), im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, eine im Sigma 8,9- bzw. im Rectum 14,3fache Induktion und eine deutlicher ausgeprägte Induktion von 26,6- bzw. 33,3fache bei den entzündeten Colitis ulcerosa Proben (Abb.3.4.2h.).



Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
 Probenanzahl: n-krank - histopath. nicht entzündet: Sigma:7, Rectum:6
 n-gesund: Sigma:11, Rectum:11
 Methode: quantitative Real-Time-PCR



Probenart: Biopsiematerial von Patienten mit histopath. gesicherter Diagnose: Colitis ulcerosa
 Probenanzahl: n-krank - histopath. entzündet: Sigma:12, Rectum:12
 n-gesund: Sigma:11, Rectum:10
 Methode: quantitative Real-Time-PCR

3.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Gewebeproben

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Biopsieproben:

Genexpression chronisch entzündliche Darmerkrankung	Darmabschnitt	IL8	PAR2	PSTI	T8
M. Crohn nicht entzündet	terminales Ileum	+	0	+	+
	Coecum	+	+	+	++
	Sigma	++	+	+	+
	Rectum	++	+	+	++
M. Crohn entzündet	terminales Ileum	++	0	++	++
	Coecum	+	0	+	+++
	Sigma	++	0	+	+++
	Rectum	++	0	+	++
Colitis ulcerosa nicht entzündet	Sigma	+	0	+	+
	Rectum	+	-	+	++
Colitis ulcerosa entzündet	Sigma	++	0	+	++
	Rectum	++	0	0	++
<p> $>100 = +++$ (hoch) $>10 = ++$ (mittelwertig) $>1,5 = +$ (gering) $+/- = 0$ $<0,75 = -$ $<0,5 = --$ </p>					

Die Genexpression von IL8 war bei beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (M. Crohn, Colitis ulcerosa) in den nicht entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 7fach, Coecum: 3fach, Sigma: 15fach, Rectum: 35fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 4fach, Rectum: 2fach), wie auch bei den entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 12fach, Coecum: 8fach, Sigma: 17fach, Rectum: 14fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 14fach, Rectum: 45fach), im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gesteigert

Bei der Expression von PAR2 zeigte sich bei den nicht entzündlich veränderten Patientenproben mit M. Crohn keine signifikante Veränderung im terminalen Ileum, jedoch ein Anstieg der PAR2 Expression im Coecum (2fach), Sigma (2fach) und Rectum (3fach). Bei den entzündlich veränderten M. Crohn Patientenproben zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der PAR2 Expression zur Kontrollgruppe.

Bei den Proben der Colitis ulcerosa Patienten zeigte sich weder bei den nicht entzündlich (Sigma: 0,8fach, Rectum: 0,6fach) noch bei den entzündlich veränderten (Sigma: 1,4fach, Rectum: 1fach) eine statistisch signifikante Induktion oder Inhibition der PAR2 Expression.

Die Genexpression von PSTI zeigte bei den nicht entzündlich veränderten M. Crohn Patienten Proben (term. Ileum: 2fach, Coecum: 4fach, Sigma:2,6fach, Rectum: 2,6fach) sowie bei den entzündlich veränderten Proben (term. Ileum: 12fach, Coecum: 6fach, Sigma:3fach, Rectum: 2fach) eine deutliche statistisch signifikante Steigerung. Bei den Proben des Colitis ulcerosa Kollektives zeigte sich nur im Sigma bei den nicht entzündlich veränderten (4fach), wie auch bei den entzündlich veränderten (3fach) ein statistisch signifikanter Anstieg der PSTI Genexpression. Die Expression im Rectum zeigte weder bei den nicht entzündlich veränderten Proben noch bei den entzündlich veränderten Proben einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Die Genexpression von T8 wies bei beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in den nicht entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 6fach, Coecum: 12fach, Sigma:8fach, Rectum: 20fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 9fach, Rectum: 14fach) wie auch bei den entzündlich veränderten Proben (M. Crohn: term. Ileum: 10fach, Coecum: 103fach, Sigma:107fach, Rectum: 90fach sowie Colitis ulcerosa: Sigma: 27fach, Rectum: 33fach) eine deutliche Steigerung im Vergleich zur Expression der gesunden Kontrollgruppe auf.

4. Diskussion

Seit je her spielen entzündliche Vorgänge und deren beeinflussende Faktoren sowie Diagnostik und Therapie in der Medizin eine bedeutende Rolle. Jedoch laufen entzündliche Vorgänge in den unterschiedlichen Geweben spezifisch induziert und reguliert ab. Das genaue Verständnis über die Genese, Einflussfaktoren und den Verlauf einer Entzündungsreaktion ist für die Behandlung von Krankheiten und für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte von großer Bedeutung. Die Aktivierung von PAR2 in verschiedenen (nicht gastrointestinalen) Organen führt zu Reaktionen, die als pro-inflammatorisch einzustufen sind. Dazu zählen, wie schon erwähnt, die Relaxation von Blutgefäßen (34), Hypotension (17, 77), die vermehrte Adhäsion und Migration von Leukozyten und Granulozyten (92, 93), verstärkte Gefäßdurchlässigkeit und Ödem (86) und der neurogene Schmerz. Zudem zeigte sich in Folge einer PAR2 Aktivierung ein Anstieg von Prostaglandinen und Zytokinen (90). Im Gegenzug konnte bei intestinalen Epithelzellen nach der Stimulation mit Zytokinen (68) oder durch bakterielle Infektion (60) ein Anstieg der PAR2 Expression nachgewiesen werden.

All diese Konsequenzen einer PAR2-Aktivierung sind charakteristische Zeichen einer entzündlichen Reaktion und legen für PAR2 eine bedeutende Rolle in der Induktion und im Verlauf eines Entzündungsprozesses nahe.

Um die Rolle von PAR2 und seine Funktion modifizierende Proteasen und Proteaseinhibitoren in einer Entzündung näher zu charakterisieren, untersuchten wir verschiedene in vitro und in vivo Modelle. Zunächst wurde eine Entzündungsreaktion in den intestinalen Epithelzelllinien HT29 und Caco2 durch Exposition gegenüber proinflammatorischen Zytokinen und Bakterien induziert. Im nächsten Schritt untersuchten wir das Expressionsmuster von PAR2 und PAR2 regulierenden Proteinen im DSS-Colitis-Modell der Maus und zuletzt in Darmschleimhautproben von Patienten mit Colitis ulcerosa und M. Crohn.

In unseren in-vitro Studien an intestinalen Epithelzellen verwendeten wir das proinflammatorische Zytokin IL-8 als Marker für die induzierte Entzündung. Über die Expression und Sekretion von Zytokinen, besonders von IL-8, durch die intestinalen Epithelzelllinien, HT29 und Caco2, gibt es bereits genauere Untersuchungen.

IL-8 ist ein Zytokin aus der Familie der CXC-Chemokine. Es wird auf proinflammatorische Stimuli, wie IL1- β , TNF- α (4) und bakterielle Infektion (45) von nicht gastrointestinalen Zellen, wie Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sezerniert und bewirkt z.B. Chemotaxis von Leukozyten.

Eine Induktion von IL-8 wurde für die Zelllinien HT29 und Caco2 als Antwort auf proinflammatorische Stimuli (IL-1 β , TNF- α , Interferon- γ (IFN- γ) und bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS)) gezeigt (30, 33, 45).

Daig et al. (Universität Regensburg) konnten mittels Northern Blot zeigen, dass auch intestinale Epithelzellen, welche aus der Darmschleimhaut von Biopsaten oder Resektaten bzw. bei chirurgischen Eingriffen gewonnen wurden, IL1 β -Rezeptorantagonisten- und Interleukin 8 (IL-8) - mRNA synthetisieren (26).

Wie schon Eingangs erwähnt, ist die Rolle und Funktion von PAR2 im Gastrointestinaltrakt in Physiologie und Pathophysiologie unklar. Erwiesen ist, dass die Stimulation von intestinalen Epithelzellen durch Zytokine (68) oder durch eine bakterielle Infektion (60) zu einem Anstieg der PAR2 Expression führt.

Um die Funktion von PAR2 besser verstehen zu können, wurden in der Vergangenheit einige Studien mit Entzündungsmodellen in vitro und in vivo durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass PAR2 in dermalen Kapillarendothelzellen exprimiert wird und dessen Aktivierung mit der Produktion von IL-8 und IL-1 in Zusammenhang steht. Ebenfalls führte die Stimulation von PAR2 durch PAR2 Agonisten zu einem Anstieg der IL-8 und IL-1 Sekretion (81).

Es konnte das Vorhandensein des funktionellen Rezeptors sowie die erhöhte Expression von IL-8 und IL-1 im Enzym-linked immunosorbent assay (Elisa) und in der RT-PCR gezeigt werden (81). Die Studienergebnisse proklamierten für PAR2 initiale und modulierende Effekte bei entzündlichen Reaktionen.

Eine spätere Studie mit nativen Mäusen zeigte, dass es unter anderem nach PAR2 Aktivierung zu erhöhter mukosaler Permeabilität und bakterieller Translokation in peritonealen Organen (12) kommt und legte ebenfalls für den Rezeptor proinflammatorische Funktionen nahe. Weitere Studien konnten die Expression von PAR2 in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, also in für die Entzündungsantwort essentiellen Zellen nachweisen (41, 61).

Eine andere Arbeitsgruppe welche von der proinflammatorischen Wirkung der PAR2 Aktivierung ausging, wollte in einem PAR2 Knock-Out-Maus-Modell bei Mäusen mit einem Mangel an PAR2 die proinflammatorische Wirkung untermauern. Das Ergebnis verdeutlichte, dass Mäuse mit einem Mangel an PAR2, nach chirurgischer Irritation und Injektion mit PAR2 aktivierendem Peptid, eine verzögerte entzündliche Reaktion aufwiesen. Im Gegensatz dazu war bei Wildtyp-Tieren eine über PAR2 Aktivierung entstandene Entzündungsreaktion nachweisbar (59).

In weiteren Studien befassten sich zwei Entzündungsmodelle mit PAR2 Knock-Out Mäusen näher mit dem Zusammenhang der Aktivierung von PAR2 und der Auslösung von Entzündungsprozessen und konnten so für PAR2 die proinflammatorische Wirkung erhärten.

Im ersten Versuchsaufbau wurde der Zusammenhang zwischen der PAR2 Aktivierung und der Entstehung von entzündlichen Gelenkerkrankungen (Arthritis) bei Mäusen untersucht (31). Im zweiten Modell wurde die Rolle von PAR2 in den Atemwegen von Mäusen und der Zusammenhang zwischen PAR2 Aktivierung und der Infiltration der Atemwege durch eosinophile Granulozyten und die Hyperreaktivität des Bronchialsystems im Sinne der Entstehung von Asthma bronchiale näher beleuchtet (79).

In beiden Untersuchungen zeigte das Mauskollektiv, das einen Mangel an PAR2 aufwies, eine deutliche Minderung des Ausmaßes der Entzündungsreaktion bzw. ein Ausbleiben des entzündlichen Prozesses, während bei den Tieren der jeweiligen Kontrollgruppen ausgeprägte Entzündungsreaktionen zu erkennen waren.

Die Ergebnisse der genannten Studien können als weitere Hinweise für die proinflammatorische Wirkung von PAR2 angesehen werden.

Dagegen führte das synthetisch hergestellte PAR2 aktivierende Peptid in einer Studie eines TNBS-Maus-Kolitis-Modells zu protektiven, antiinflammatorischen Effekten. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von sezernierten Zytokinen durch T-Helfer Zellen des Types I (Th-1 Zellen) und das Ausmaß der Entzündung mikroskopisch und makroskopisch reduziert sowie die Überlebensrate der Tiere gesteigert werden konnte (32). Eine weitere Studie, die auf eine antiinflammatorische Wirkung von PAR2 schließen lässt, befasste sich mit der durch PAR2 vermittelten Schleimsekretion im Magen von männlichen Ratten. Durch die Aktivierung von PAR2 konnte in diesem Experiment die Schleimsekretion gesteigert und der schädliche Einfluss des HCl-Ethanol-Gemisches (60% Ethanol, 150mM HCl) und Indomethazin (9mg/kg KG) gemindert werden (49).

Zusammengenommen zeigten alle genannten Arbeiten, bis auf die von Fiorucci (32) und die von Kawabata (49), die für PAR2 eine antiinflammatorische Wirkung nachwiesen, dass es durch die Aktivierung von PAR2, sei es durch Proteasen wie Trypsin, β -Tryptase oder PAR2 aktivierendem Peptid, zu proinflammatorischen Effekten kommt.

Anders sieht die Studienlage bzw. Datenlage zur Expression von PAR2 bei DSS-Colitis Maus-Modellen oder humanen Proben aus. Hier gibt es keine oder nur unzureichende

Daten zur Genexpression von PAR2 in experimentellen Colitis Maus-Modellen, oder in humanen M. Crohn oder Colitis ulcerosa Patientenproben.

Zytokine spielen eine entscheidende Rolle in der akute-Phase Reaktion von intestinalen Epithelzellen. Stadnyk et al. belegten, dass es nach Infektion von Monolayern von intestinalen Epithelzellen des Dünndarms von männlichen Ratten des Types „Lewis“ mit *Trichinella spiralis* zu einem mRNA-Anstieg von IL1 β kommt (83). Außerdem konnte durch die Arbeitsgruppe ein Anstieg der IL1 β Produktion bei intestinalen Epithelzellen der Ratte (IEC-18) nachgewiesen werden, wenn verhindert wurde, dass diese nach dem Ablösen des Monolayers von der Well-Oberfläche einen erneuten Kontakt zum Well erhalten (84). Diese Reaktion im Zellkulturmodell, welche durch Stress zur Apoptose der intestinalen Epithelzellen führt, wird auch „Anoikis“ genannt.

Auch konnten Jung et al. nachweisen, dass die Exposition von humanen Kolonkarzinomzelllinien (HT29 und Caco2) gegenüber TNF- α , IL-1 α , IFN- γ und bakteriellem Lipopolysacharid (LPS) eine Entzündungsantwort der Zelllinien mit einem Anstieg der Genexpression von IL-8, TNF- α und MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) auslösen (45). Somit konnte also durch Infektion von intestinalen Epithelzellen, Anoikis sowie Exposition von intestinalen Epithelzellen gegenüber bestimmten Entzündungsmediatoren ein Anstieg der Zytokinsekretion nachgewiesen werden.

Typische Zeichen von Entzündungsvorgängen im Bereich des Dünndarmes sind die Atrophie von Zotten und die Hyperplasie der Krypten. Es wird angenommen, dass es durch die Entzündung zu einer Veränderung des Differenzierungsgrades des Oberflächenepithels zugunsten des undifferenzierteren Oberflächenepithels mit der Verringerung von Hydrolasen im Bereich des Bürstensaumepithels kommt (105). Eine solche Hydrolase stellt die Hydrolase Sucrase-Isomaltase dar. Die Expression von Sucrase-Isomaltase, ein Marker für den Differenzierungsgrad des Oberflächenepithels, wird nach Stimulation von intestinalen Epithelzellen mit Zytokinen herunterreguliert. Vor allem INF- γ und Interleukin 6 (IL-6) führten zu einer deutlichen Steigerung der Sucrase-Isomaltase (105).

Wie bereits beschrieben, wird PAR2 durch verschiedene Proteasen gespalten und damit aktiviert (11, 20, 52, 63, 90, 92). Ein Weg, die Aktivierung von PAR2 zu beeinflussen bzw. zu regulieren, wäre, die verschiedenen Proteasen zu neutralisieren oder unwirksam zu machen. Dies ist sehr gut im Fall des pankreatischen sekretorischen Trypsin Inhibitors (PSTI) geklärt. PSTI inaktiviert Trypsin, indem es als temporäres Substrat für Trypsin fungiert (55).

Es konnte bewiesen werden, dass Mutationen im PSTI-Gen und damit eine fehlerhafte Inhibierung von Trypsin zur Ausbildung einer chronischen Pankreatitis führen (100). Des Weiteren konnte belegt werden, dass während der Ausbildung einer akuten Pankreatitis PAR2 verstärkt aktiviert ist (71). Das Zusammenspiel von Trypsin mit PSTI und PAR2 in der Pathogenese und in der Progression einer Pankreatitis von bedeutender Rolle (36).

Somit ist die Inaktivierung einer PAR2 aktivierenden Protease durch PSTI als PAR2 regulierend zu verstehen und aus diesem Grund haben wir für unsere Versuche Trypsin und PSTI als PAR2 regulierende Gene ausgewählt und die Veränderung der Genexpression dieser Gene in den Versuchen bestimmt.

Da es bisher nur unzureichende Daten zum Expressionsverhalten von PAR2 in vitro, in vivo sowie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gibt, beabsichtigten wir in unseren Experimenten die Regulation von PAR2, Trypsin und PSTI bei den intestinalen Epithelzelllinien HT29 und Caco2 in vitro Entzündungsmodellen durch Stimulation mit Zytokinen (IL1- β , TNF- α , LPS, IFN- γ) und nach bakterieller Infektion, sowie in vivo im DSS-Colitis Maus-Modell und in Proben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa näher zu untersuchen. Des Weiteren interessierte uns, ob ein messbarer Unterschied in der Expression von PAR2 und der PAR2 regulierenden Gene PSTI und T8 zwischen der differenzierten Zelllinie Caco2 im Vergleich zur undifferenzierteren Zelllinie HT29 besteht.

4.1. HT29 und Caco2 mit Zytokinen

Wir konnten in unserem Entzündungsmodell mit Zytokinen, genau wie in den vorherigen Studien, einen IL-8 Anstieg bei HT29 und Caco2 nach Stimulation mit IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und LPS nachweisen. Dabei fiel jedoch der IL-8 Anstieg unter IFN- γ am geringsten aus. Die stärkste IL-8 Reaktion von HT29 und Caco2 konnte nach Stimulation mit IL-1 β , der Kombination von IL-1 β mit Dexamethason und Dexamethason allein beobachtet werden.

PAR2 reagierte, wie auch andere Studien belegen (31, 59, 79, 81), auf entzündliche Reize mit einem Anstieg der Expression. Dieser war für IL1 β mit 17facher Erhöhung am eindrucksvollsten. Insgesamt zeigten nach Zytokin-Induktion PSTI und Trypsin (T8) ähnliche zeitliche Verläufe, so dass ein modulierender Effekt von proteolytischer und Protease-inhibierender Wirkung auf PAR2 möglich wäre.

Die Kombination von IL1 β und Dexamethason führte in beiden Zelllinien zu einem deutlich geringeren Anstieg von IL-8, welcher bei HT29 auf ein Sechstel und bei Caco2 auf die Hälfte der ursprünglichen Reizantwort (IL1 β allein) reduziert war. Auch zeigten die Expressionsraten von PAR2, PSTI und T8 im Vergleich zur Grundexpression, d.h. der Expressionsrate einer nicht stimulierten Zelllinie, niedrigere (PSTI, T8) bis unveränderte (PAR2) Aktivitäten. Die niedrigere bzw. unveränderte Expression und damit ausbleibende Reaktion von PAR2 könnte ein anti-inflammatorischer Effekt von Dexamethason auf den Entzündungsreiz durch IL1 β sein. Wie bereits in zahlreichen Studien beschrieben wurde, stört Dexamethason die Transkription von proinflammatorisch wirkenden Zytokinen indem es die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B verändert bzw. an Histone bindet und so die Transkription stört (5, 76). Obwohl die Zeitspanne in unserem Versuchsaufbau relativ kurz war, könnte es einen Zusammenhang zwischen der niedrigeren PAR2 Expression und den geringeren Anstiegen von PSTI und T8 geben. Bis dato liegt jedoch keine weitere Studie vor, die über den Zusammenhang von PAR2, PSTI, T8 in Verbindung mit stimulativen Effekten bei Dexamethason oder IL1 β berichtet.

Die Wirkung von Dexamethason allein zeigte bei HT29 in den ersten 24 Stunden keine Veränderung der Expressionsraten aller Gene. Jedoch stiegen PAR2, PSTI und T8 nach 48 Stunden stark an. Möglicherweise könnte auch dieser späte Anstieg von PSTI und T8, den PAR2 regulierenden Genen, ein anti-inflammatorischer Effekt des Dexamethasons sein. Ein Hinweis könnte der Verlauf der Genexpressionen in beiden Versuchen (IL-1 β mit Dexamethason und Dexamethason allein) sein die bis auf die Ausprägung der Expressionveränderung ähnlich sind.

Auffallend ist auch, dass die höher differenzierte Zelllinie Caco2 eine stärkere Induktion der IL8 Genexpression (450fach) als die undifferenziertere Zelllinie HT29 (322fach) aufwies, wobei die Expressionsraten von PAR2, PSTI und T8 bei Caco2 geringere Anstiege zeigten als bei HT29 zu beobachten waren. Zudem reagierte die Zelllinie Caco2 mit einer geringeren Expressionssteigerung von PAR2, PSTI und T8 auf die Zugabe von Dexamethason als die Zelllinie HT29. Jedoch besitzen unterschiedlich differenzierte Zelllinien eine unterschiedliche Ausstattung an Transkriptionsfaktoren. Es ist schwierig zu sagen, ob es einen funktionellen Unterschied zwischen einer 322- und 450fachen RNA-Induktion gibt. Die deutlich höhere Expression von IL8 im Vergleich zu den anderen Genen PAR2, PSTI und T8 bei Caco2 in Bezug auf HT29 kann ein Hinweis auf eine gezielter ablaufende Entzündungsreaktion der höher differenzierten

Zelllinie sein, die auf entzündliche Stimuli nicht mit einer Induktion aller gemessenen Gene sondern nur spezifisch mit dem Anstieg von IL8 antwortet. Eine andere Frage, die sich stellt, ist in wie weit die Regulation von PAR2 und den PAR2 regulierenden Genen wirklich differenzierungsabhängig abläuft.

4.2. HT29 und Caco2 mit Bakterien

4.2.1. HT29 und Caco2 mit Bakterien – Versuchsaufbau 1

Es ist bekannt, dass intestinale Epithelzellen auf eine Infektion mit Bakterien mit einer Steigerung der IL-8 Expression reagieren können. Eine Arbeit konnte zeigen, dass es nach Infektion von HT29-Zellen, Caco2-Zellen und T84-Zellen, alles humane Kolonkarzinom Zelllinien, mit invasiven Bakterien wie *Yersinia enterocolitica* 08, *Listeria monozytogenes* 4b und *E. coli* 0157 zu einem deutlichen Anstieg der Expression von Zytokinen, z.B. TNF- α und IL-8, kam (45). Demgegenüber zeigte eine Infektion der genannten Zelllinien keinen Anstieg von IL-8, nachdem diese mit dem nichtinvasiven Keim der physiologischen Darmflora, *Enterococcus faecium*, kontaminiert wurden (45). Des Weiteren ist in einer Studie belegt, dass das Flagellin des enteropathogenen *E.coli* in der humanen Kolonkarzinom Zelllinie T84 einen Anstieg der IL-8 Produktion bewirkte (104). Weitere Studien konnten nachweisen, dass das Bakterium *Porphyromonas gingivalis* über seine bakterielle Protease Gingipain zu einer Aktivierung von PAR2 führte (60). Durch andere Stämme von *E.coli* wurden Serin-Proteasen freigesetzt (57) bzw. bestimmte Signal-Peptidasen exprimiert (87), welche membranständige Proteine spalten und so unter Umständen im Stande sind PAR2 zu aktivieren. Dies ist bei der membranständigen Serinprotease (MTSP-1) schon belegt worden (90).

Später veröffentlichte Studien konnten nachweisen, dass es durch den Kontakt von Gingipain mit oralen Epithelzellen in diesen zu einer Erhöhung der Genexpression von PAR2 kommt (37, 60).

Auch andere Proteasen, wie die Elastase der Leukozyten sind in der Lage PAR2 in humanen Fibroblasten zu aktivieren (91). Abraham et al. konnten zeigen, dass Osteoblasten PAR2 exprimieren und dass es nach der Stimulation mit dem PAR2 aktivierenden Peptid in Osteoblasten zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} Spiegels kommt. Die gleiche Reaktion kann intrazellulär auch nach der Aktivierung von PAR2 gefunden werden (1).

Humane Fibroblasten sezernierten nach PAR2 Aktivierung mit dem PAR2 aktivierenden Peptid proinflammatorisch wirkende Zytokine wie IL8 (91) und humane Gingivaepithelzellen setzten nach Stimulation mit Gingipain IL-6 frei, welches zu einer starken Stimulation von Osteoklasten führen kann (60).

Während einer Parodontitis treten klinisch ein Kollagenabbau, die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und der Verlust von Alveolarknochen nebeneinander auf. Die gleichzeitige Aktivierung von PAR2 z.B. in Fibroblasten und in neutrophilen Granulozyten bzw. durch die bakterielle Protease Gingipain ausgeschieden von *Porphyromonas gingivalis* in oralem Gingivaepithel, könnte zusammengenommen das klinische Erscheinungsbild der Parodontitis mit Hypervaskularisation, Kollagendestruktion und Alveolarknochenabbau verursachen. Hieraus könnte sich ein Erklärungsversuch für die Genese der Parodontitis ergeben. Ein Hinweis auf die Richtigkeit dieser Theorie ist eine Arbeit, bei der die Ausprägung des Knochenabbaus bei Wildtypmäusen und PAR2-Knock-Out Mäusen miteinander verglichen wurde. Hier führte die Aktivierung von PAR2 bei den Wildtypmäusen, im Vergleich zu den Knock out Mäusen, zu einer deutlich schwereren Ausprägung einer Parodontitis mit stärkerem Knochenabbau (39).

Außerdem konnte in einer weiteren in vitro Studie mit Knochenmarkszellen der Maus gezeigt werden, dass die Aktivierung von PAR2 die Differenzierung von Osteoklasten und damit den unkontrollierten Knochenabbau inhibiert. Somit wäre PAR2 eine knochensubstanzerhaltende Wirkung zuzuschreiben (82).

Jedoch waren alle diese Untersuchungen in vitro Studien und es bleibt unschlüssig, ob diese Systeme in vivo die gleichen Aufgaben bzw. Reaktionen zeigen.

In einer in vivo Studie konnte belegt werden, dass die Aktivierung von PAR2 durch das PAR-2 aktivierende Peptid SLIGRL bei männlichen Wistar Ratten zum Neuauftreten von Parodontitis führte bzw. dass sich das klinische Bild einer bestehenden Parodontitis deutlich verschlechterte (38).

In der Gingiva der eingesetzten Versuchstiere war eine erhöhte Infiltration von neutrophilen Granulozyten nachweisbar und es konnte eine deutliche Resorption des Alveolarknochens beobachtet werden. Es zeigte sich eine Überexpression von COX-1 und COX-2 sowie der Metalloprotease MMP-2 und MMP-9 bei den Tieren mit PAR2 induzierter Parodontitis. Nachweislich wurde das klinische Erscheinungsbild der Parodontitis durch den Einsatz von COX-1 Inhibitoren gemindert. Dies wurde als weiterer Hinweis der proinflammatorischen Rolle von PAR2 in der Entstehung der Parodontitis gewertet (38).

In einer weiteren Studie wurden Wildtypmäuse (C57BL/6) und Mäuse mit einem Mangel an PAR2 (C57BL/6) *Citrobacter rodentium*, einem eine infektiöse Colitis auslösenden gram negativen Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae, ausgesetzt. In der intraluminalen Darmflüssigkeit der Versuchstiere konnten durch die Bakterien sezernierte aktive Serinproteasen nachgewiesen werden, welche auch in der Lage sind PAR2 zu aktivieren. Das Ausmaß der infektiösen Kolitis durch *Citrobacter rodentium*, das über Entzündungsindizes bestimmt wurde, war bei Tieren mit einem Mangel an PAR2 deutlich geringer (35).

Alle diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass es nach Kontakt von Epithelzellen unterschiedlicher Gewebe mit invasiven Bakterien (*Prophyromonas gingivalis*, *Citrobacter rodentium*) zu einer Auslösung einer Entzündungsreaktion kommt, welche initial unabhängig von der zellulären Immunität abläuft und sich von der Reaktion der Epithelzellen auf nichtinvasive Bakterien unterscheidet (45).

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass Caco-2-Zellen eine im Gegensatz zu HT29-Zellen hochdifferenzierte Zelllinie, „empfindlicher“ auf die bakterielle Besiedlung reagieren als HT29. Dies wird zum einen am frühen Zelltod nach 12h durch Infektion mit *Salmonella typhi* und zum anderen durch die höhere absolute und relative Stimulation von PAR2 und IL-8 deutlich.

Der invasive, gram negative Keim *Salmonella typhi* und der ebenfalls invasive, gram positive Keim *Listeria monocytogenes* führten zu einer raschen und ausgeprägten Induktion von IL-8 und PAR2. Unterschiede zur Reaktion auf *Escherichia coli* bestanden nicht so sehr in der Ausprägung der Induktion, als in der Geschwindigkeit der Reaktion.

Die Besiedlung mit dem invasiven, gram negativen Bakterium *Yersinia enterocolitica* resultierte nur in einer schwachen Regulation von IL-8 und PAR2.

Die unterschiedliche Reaktion der intestinalen Epithelzellen auf die Infektion mit invasiven und nicht invasiven Bakterien zeigte sich auch in der Regulation der Genexpression von Trypsin (T8) und PSTI.

Diese wurden zumeist, wie auch schon in den Zytokin-Experimenten festgestellt, parallel reguliert. Es konnte also kein Überwiegen der proteolytischen oder protease-inhibitorischen Aktivität nachgewiesen werden. Die Regulation von T8 und PSTI erwies sich unabhängig von der Pathogenität der Bakterien. Deutlich wird dies durch die Reaktion der Epithelzellen auf *Salmonella typhi* und den *Escherichia coli* Stamm (ATCC25922).

Während der apathogene Keim der normalen Darmflora *Enterococcus faecium* in beiden Zelllinien zu keiner wesentlichen Induktion der untersuchten Gene führte, war nach der Besiedlung mit einem apathogenen *Escherichia coli* Stamm (ATCC25922) eine rasche und ausgeprägte IL-8 Induktion sowie eine deutliche und etwas verzögerte PAR2 Induktion zu beobachten.

Dies zeigt, dass auch Bakterien der physiologischen Darmflora zur Immunantwort und Regulation von PAR2 in intestinalen Epithelzellen führen.

Letztendlich führte die Besiedlung bzw. die Infektion intestinaler Epithelzellen mit Keimen der physiologischen Darmflora, wie auch invasiven gram negativen und positiven Bakterien, zu einer starken Induktion von PAR2.

Dies legt nahe, dass über oder mit Hilfe von PAR2 Mikroben im Darm „wahrgenommen“ und das PAR2 sowohl zur Homöostase im physiologischen Zustand als auch zur Abwehr im pathophysiologischen Zustand beiträgt.

Obwohl die Induktion der Genexpression von PAR2 bislang nur für Gingipain von *Porphyromonas gingivalis*, der eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parodontitis spielt (60), und *Citrobacter rodentium*, Auslöser entzündlicher Darmerkrankungen (35), gezeigt werden konnte, ist auch in unserem Experiment eine direkte Aktivierung von PAR2 durch bakterielle Proteasen möglich (39). Ein weiterer Erklärungsansatz für die Steigerung der PAR2 Genexpression ist die Reaktion des intestinalen Epithels auf bestimmte Oberflächeneigenschaften oder Proteine der einzelnen Bakterienstämme. Wie schon zuvor erwähnt, konnte dies anhand des Flagellins des enteropathogenen *E.coli* bewiesen werden (104).

Zudem scheinen intestinale Epithelzellen über die Aktivierung und unterschiedlich starke Erhöhung der Genexpression von PAR2 spezifisch auf bestimmte Keime reagieren zu können.

4.2.2. HT29 und Caco2 mit Bakterien – Versuchsaufbau 2

Um genauere Aussagen über den „Auslöser“ der PAR2 - Induktion machen zu können und mögliche Ursachen für die enteroprotektive Wirkung von probiotischen Bakterien, wie z.B. durch *E.coli* Nissle 1917, zu ergründen, haben wir im zweiten Versuchsaufbau drei unterschiedliche *Escherichia coli* Stämme, 1. den enteropathogenen *E. coli* ATCC 700790, 2. den enterohämorrhagischen *E.coli* EHEC E-0157 und 3. den apathogen probiotischen *E.coli* Nissle 1917, deren steril filtrierte Überstände und eine

hitzeinaktivierte Präparation von Bakterienüberresten auf ihre Wirkung auf intestinale Epithelzellen hin näher untersucht und miteinander verglichen.

Es ist bekannt, dass enteropathogene *E.coli* Stämme, wie auch der apathogene Stamm *E.coli* Nissle 1917 und dessen hitzeinaktivierte Bestandteile, eine IL-8 Induktion verursachen (56, 104).

In einer anderen Studie wurde das Ausmaß der Produktion von IL-8 nach Kontakt von HT29, mit Anteilen von VSL#3, einem hochkonzentrierten probiotischen Präparat das 7 Bakterienstämme enthält, *Lactobacillus* GG und *E. coli* Nissle mittels ELISA miteinander verglichen. Nachweislich kam es nach Kontakt von HT29 mit *E. coli* Nissle zu einem Anstieg der IL-8 Sekretion, während diese bei Kontakt mit VSL#3 und *Lactobacillus* GG ausblieb.

Es konnte gezeigt werden, dass durch *E.coli* Nissle 1917, dessen hitzeinaktivierte Überreste und sogar DNS das Ausmaß einer akuten Dextran–Sodium-Sulfate Kolitis bzw. chronischen Kolitis in einem Maus Modell deutlich gemindert werden konnte (48). In zwei großen Studien an Colitis ulcerosa Patienten wurde nachgewiesen, dass die Therapie mit *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor®) in der Remissionsphase dem langjährig etablierten Präparat Mesalazin äquivalent ist (54). Damit stellt *E. coli* Nissle 1917 in dieser Indikation eine Alternative zum antiinflammatorisch wirkenden Medikament Mesalazin dar.

Dies verdeutlicht den enteroprotektiven Effekt von *E.coli* Nissle 1917 und unterstreicht erneut die differenzierte Reaktion der intestinalen Epithelzellen auf Kontakt mit unterschiedlichen Bakterienstämmen.

Eine ähnliche enteroprotektive Wirkung ist auch für das Bakterium *Lactobacillus casei* gezeigt worden (10). In dem Experiment führte die Co-Kultur von *L. casei* mit humanen intestinalen Epithelzellen von zwei Patienten mit M. Crohn zu einer Reduktion der TNF- α - und IL-8 Sekretion. Wurden nachfolgend *E. coli* und *L. casei* in Co-Kultur mit den Patientenproben gebracht, zeigte sich erneut eine Reduktion der TNF- α - und IL-8 Sekretion. Eine genaue Aussage über den Grund der nichtpathogenen Wirkung bzw. der enteroprotektiven Wirkung von *L. casei* und *E. coli* Nissle ist momentan jedoch trotzdem nur unzureichend möglich.

Eventuell ist die verminderte Produktion der proinflammatorischen Zytokine eine Ursache der enteroprotektiven Wirkung von *L. casei*. Einige Autoren gehen sogar von einer dynamischen Wechselwirkung zwischen Wirt und Bakterium aus.

Für das Bakterium *Bacteroides thetaiotaomicron* konnte eine Art Partnerschaft zwischen Wirt und Bakterium nachgewiesen werden (40). Das Bakterium erhält einen bestimmten

Nährstoff durch den Wirt und zeigt diesem, in welchem Maß es den Nährstoff benötigt. Durch das Vorherrschen von *Bacteroides thetaiotaomicron* wird eine Überwucherung des intestinalen Epitheliums durch andere möglicherweise pathogene Keime verhindert. Um die Wirkung von nichtpathogenen und pathogenen Bakterien bzw. die Reaktion der intestinalen Epithelzellen besser verstehen zu können, haben wir die intestinalen Epithelzellen in Bezug auf die Genexpression von PAR2 und PAR2 regulierenden Gene näher untersucht.

Eine weitere Möglichkeit intestinaler Epithelzellen auf Reize wie z.B. eine Besiedlung durch Mikroorganismen zu reagieren, ist die Bildung und Sekretion von antimikrobiell wirkenden Peptiden, sogenannten Defensinen. Dies sind kationische Peptide mit 3 typischen intramolekularen Disulfidbrücken, welche die Zellmembran von Bakterien zerstören können. Es ist bekannt, dass β -Defensine Mikroorganismen, wie z.B. das Protozoon *Cryptosporidium parvum* abtöten können (29).

Es konnte gezeigt werden, dass die β -Defensine hBD-1 und hBD-2 von humanen Kolonepithelzellen in vivo und von humanen Kolonkarzinomzellen in vitro, wie HT29 und Caco2, exprimiert werden (70). Es handelt sich hierbei um eine konstitutive oder housekeeping Expression. Das β -Defensin hBD-1 wird dabei in vitro von HT29 und Caco2 sowie von humanem Kolonepithel in vivo generell exprimiert und unterlag nach Stimulation sowie Infektion keiner oder nur geringer Regulation (70). Das β -Defensin hBD-2 hingegen war in unstimulierten Zellen wie HT29 und Caco2 nicht nachweisbar. Wurden die Zelllinien jedoch mit IL1- β oder enteroinvasiven Bakterien wie *Salmonella typhi* und dem enteroinvasiven Stamm von *Escherichia coli* (ATCC 43892) stimuliert, kam es zu einem deutlichen Anstieg der Genexpression von hBD-2 nicht jedoch hBD-1 (70).

Wehkamp et al. belegten in einer Studie, dass durch das probiotische Bakterium *Escherichia coli* Nissle 1917 in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco2 die Genexpression von β -Defensinen, speziell hBD-2, gesteigert wurde (98).

Chung et al. konnten zudem über die Aktivierung von PAR2 durch *Prophyromonas gingivalis* einen Anstieg der Expression des antimikrobiell wirkenden Defensines hBD-2 nachweisen und damit eine antimikrobielle Wirkung von PAR2 bei humanen Gingivaepithelzellen belegen (16).

In unserem 2. Versuchsaufbau konnten wir zunächst die Versuchsergebnisse des ersten Versuchsaufbaus bestätigen. Caco-2 Zellen reagierten auch hier „empfindlicher“ auf die bakterielle Besiedlung bzw. deren Überreste als HT29 Zellen. Dies wird zum einen an den höheren absoluten und relativen Werten der PAR2 und IL-8 Induktion als auch an

der zeitlich schnelleren PAR2 Regulation auf die Stimulation deutlich. So wurde PAR2 bei Caco2-Zellen innerhalb der ersten zwei bis vier Stunden, bei HT29-Zellen nach erst vier bis acht Stunden nach Stimulation reguliert.

In unseren Studien führten alle Bakterien zu einer deutlichen Induktion von IL-8 und PAR2, was die vorherigen Erkenntnisse, dass pathogene und apathogene Bakterien eine Steigerung der IL-8 und PAR2 Expression hervorrufen, weiter untermauert.

Das Ausmaß der PAR2 Induktion nahm bei allen E.coli Stämmen vom hitzeinaktivierten Bakterium über das vitale Bakterium zum Überstand hin deutlich ab. In der IL-8 Induktion erwiesen sich die Überstände der Bakterien als schwächste Aktivatoren der IL-8 bzw. PAR2 Expression. Es fiel außerdem auf, dass bei allen Bakterien die hitzeinaktivierten Überreste die stärksten Induktoren der IL-8 bzw. der PAR2 Expression darstellten. Es ist anzunehmen, dass es bei der Inaktivierung zu einer Zerstörung der Bakterien kommt. Dabei werden zusätzlich zu den Oberflächenproteinen und -lipopolisacchariden intrazelluläre Bakterienbestandteile freigesetzt, die möglicherweise eine ausgeprägtere Stimulation der Epithelzellen bewirken.

Einen ähnlichen Effekt stellt die aus der Allergologie bekannte Herxheimer-Jarisch-Reaktion dar. Hierbei handelt es sich um eine nach antibiotischer Therapie auftretende starke Immunreaktion. Die genaue Ursache ist immer noch unbekannt, jedoch wird angenommen, dass es nach Anwendung von Penicillin zu einem Absterben oder zu einem Zerfall von Bakterien kommt. Dabei werden bestimmte Endotoxine, intrazelluläre Bakterienbestandteile, in großen Mengen freigesetzt, die die nachfolgende Immunreaktion hervorrufen (42, 103).

Der auffällige Unterschied der Reaktionen der Zelllinien auf die vitalen sowie die hitzeinaktivierten Bakterien bzw. den Überstand könnte anzeigen, dass die intestinalen Epithelzellen eher auf vitale Bakterien, auf Hüllproteine oder auf Endotoxine reagieren, als auf von Bakterien ausgeschiedene Substanzen. Hier spielt vor allem eine Rolle, dass Proteine durch das Erhitzen denaturiert werden. Deshalb stellen wahrscheinlich Lipopolysaccharidstrukturen wie LPS einen starken Induktionsreiz dar.

In der Geschwindigkeit der Expressionsveränderung zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede der einzelnen E.coli Stämme. Hierbei erfolgte der schnellste und zugleich stärkste Anstieg der PAR2 Regulation nach Infektion mit E.coli Nissle 1917. Dieser führte schon innerhalb der ersten 2 Stunden nach der Infektion mit dem vitalen Bakterium zu einer Steigerung der PAR2 Genexpression um das 7fache. Das hitzeinaktivierte Bakterium steigerte die PAR2 Genexpression sogar auf das 10fache des Ausgangswertes.

Für alle anderen Stämme konnte dies erst nach 4 Stunden mit einem maximal 3fachen Anstieg der PAR2 Genexpression nachgewiesen werden. Es war auch auffällig, dass nach dem Kontakt der intestinalen Epithelzellen mit den hitzeinaktivierten Bakterienstämmen E.coli ATCC 700790 und EHEC E-0157 keine so starke Erhöhung der PAR2 Genexpression auftrat.

Auch für PSTI und Trypsin (T8) nahm E.coli Nissle eine Sonderstellung ein. Das vitale Bakterium zeigte eine starke (120fache) Erhöhung der T8 Expression, die beiden anderen pathogenen E.coli Stämme steigerten die T8 Expression auf maximal das 3fache des Ruhewertes.

Des Weiteren führte der Überstand von E.coli Nissle und das hitzeinaktivierte Bakterium zu einer späteren Induktion von PSTI und T8. Während die Überstände bzw. die hitzeinaktivierten pathogenen E.coli Stämme schon nach 2 bis 4 Stunden eine Regulation dieser Gene zeigten, geschah dies bei E.coli Nissle erst nach 8 bis 12 Stunden.

Die frühe PAR2-Induktion und die spätere, höhere bzw. verlängerte Induktion der PAR2 - regulierenden Gene PSTI und T8 könnte ein möglicher Faktor für die darmprotektive Wirkung von E.coli Nissle sein. Möglicherweise könnte so der proinflammatorische Einfluss von PAR2 wirkungsvoller und vor allem länger reguliert werden.

Vielleicht spielt auch der Zeitpunkt des maximalen Anstieges der PAR2 Genexpression in der durch PAR2 vermittelten Entzündungsreaktion eine Rolle.

Für den nichtpathogenen Keim E. coli Nissle konnten wie bereits erwähnt enteroprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden.(48), Möglicherweise stellt die veränderte PAR2 Genexpression bzw. die Expression PAR2 beeinflussender Gene wie T8 und PSTI intestinaler Epithelzellen auf E. coli Nissle eine Erklärung für die nichtpathogenen bzw. sogar enteroprotektiven Eigenschaften des E. coli Nissle dar.

Wie durch O'Neil et. al. bereits gezeigt, konnten auch wir einen deutlichen Unterschied im Expressionsverhalten der Zelllinien HT29 und Caco2 bei den β -Defensinen hBD-1 und hBD-2 nach Stimulation mit den o.g. Bakterien, deren hitzeinaktivierten Überresten und den Überständen nachweisen (70). Die Veränderung des Betrages der Expression von hBD-1 wird bei beiden Zelllinien deutlich geringer reguliert als die von hBD-2.

Auffällig war auch, dass die Zelllinie HT29 nach Kontakt mit den o.g. Bakterien, hitzeinaktivierten Bestandteilen und Überständen mit einer deutlichen Suppression von hBD-1 reagierte, während bei der Zelllinie Caco2 in allen Versuchen ein Anstieg der Genexpression von hBD-1 bis zum 10fachen der Ausgangsexpression messbar war.

Dies zeigt, dass undifferenzierte (HT29) bzw. differenzierte (Caco2) Zellen bei der Bildung von Defensinen unterschiedliche Reaktionsmuster auf antimikrobielle Infektionen ausbilden.

Bei beiden Zelllinien gab es im Hinblick auf die Expressionsänderung keinen Unterschied in Bezug auf das eingesetzte Bakterium, dessen hitzeinaktivierte Überreste oder dessen Überstand.

Die Genexpression von hBD-2 hingegen wurde nach Infektion mit den o.g. Bakterien, hitzeinaktivierten Überresten und Überständen dramatisch gesteigert. Bei beiden Zelllinien konnte durch das Bakterium *Escherichia coli* Nissle 1917, seine hitzeinaktivierten Bestandteile sowie seinen Überstand die Genexpression von hBD-2, am stärksten induziert werden. Es ist denkbar, dass ein erhöhter intraluminaler Gehalt an antimikrobiell wirkenden Peptiden, wie den Defensinen, einen erhöhten Schutz vor antimikrobieller Besiedlung oder Infektion darstellt.

Wie schon beschrieben, konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass *Escherichia coli* Nissle 1917 in der Lage ist in humanen Zellen die IL-8 Expression zu steigern (56) sowie bei akuten und chronischen Entzündungsmodellen (48) enteroprotektive Effekte zu bewirken. Eine spätere Studie wies nach, dass es durch die Aktivierung von PAR2 in humanen oesophagialen Epithelzellen zu einem Anstieg der Genexpression von IL-8 kam (102). Wehkamp et al. formulierten in ihrer Studie über die Wirkung von *E. coli* Nissle 1917 eine Hypothese, in der es über ein bestimmtes, bis jetzt noch nicht identifiziertes Molekül, zu einer Aktivierung des NF- κ B Kaskade kommt (98), welches nur in *E. coli* Nissle 1917 und einigen probiotischen Laktobazillusarten, nicht jedoch in über 40 weiteren *E. coli* Stämmen nachweisbar war. In einer anderen Studie, konnte gezeigt werden, dass über die Aktivierung von PAR2 eine Steigerung der Expression des β -Defensines hBD-2 reguliert wird (16), die nicht ausschließlich NF- κ B vermittelt abläuft.

Wir konnten, wie schon oben beschrieben, zeigen, dass intestinale Epithelzellen nach Kontakt mit *Escherichia coli* Nissle 1917 eine gesteigerte PAR2 Genexpression aufweisen. Alle Ergebnisse mit erhöhter PAR2-Genexpression, gesteigerter IL-8 Expression, erhöhter Expression und Sekretion von β -Defensinen und dem Vorhandensein von *Escherichia coli* Nissle 1917 zusammengekommen kann folgendes formuliert werden:

Möglicherweise führt das Vorhandensein von *Escherichia coli* Nissle 1917 zu einer verstärkten Aktivierung und Expression von PAR2 und darüber hinaus zu einer

verstärkten Expression und Sekretion von enteroprotektiven, antimikrobiell wirkenden Peptiden, wie dem β -Defensin hBD-2.

Wie schon zuvor postuliert, könnte, teilweise über PAR2 vermittelt, diese erhöhte Abwehrbereitschaft durch β -Defensine ein Teil der enteroprotektiven Wirkung von *Escherichia coli* Nissle 1917 erklären, doch dies muss in der Zukunft genauer untersucht und belegt werden.

4.3. DSS–Kolitis–Maus–Modell

Wie bereits eingangs erwähnt, führte die Aktivierung von PAR2 durch eine intraluminalen Injektion von PAR2 Agonisten (Trypsin, β -Tryptase und PAR2 aktivierendem Peptid SLIGRL) bei männlichen Mäusen (Swiss 3T3 und C57BL6) zu einem Anstieg der PAR2 Genexpression und zu einer Entzündungsreaktion mit Infiltration von Granulozyten, Zunahme der Wanddicke des Kolons, Schädigung des Gewebes und einer Zunahme der Sekretion von TH-1 abhängigen Zytokinen (IL-1, TNF- α und INF- γ). Außerdem kam es zu einer Abnahme der epithelialen Barrierefunktion mit erhöhter parazellulärer Permeabilität und der Ausbreitung von Bakterien in benachbarte Organe (12). Nachfolgend wurde durch die gleiche Arbeitsgruppe die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO), afferenter Neurone und die Verbindung zwischen intestinaler Entzündung und der Veränderung der parazellulären Permeabilität in der durch PAR2 Aktivierung ausgelösten Entzündung näher beleuchtet. Sowohl NO als auch afferente Neurone waren nachweislich an der PAR2 vermittelten Entzündung beteiligt, wobei sich kein Hinweis fand, dass die Entzündung eine Folge der verstärkten parazellulären Permeabilität war (13). Es ist bekannt, dass PAR2 durch die Mastzell-Tryptase aktiviert werden kann (20). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass auch humane Mastzellen in der Lage sind PAR2 zu exprimieren (25).

Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte die Rolle von Mastzellen und Mastzell-Tryptase und die histologischen Veränderungen bei einer DSS – induzierten Kolitis bei Ratten und den Veränderungen im Verlauf der Heilung nach Absetzen von DSS. Das Ergebnis der Untersuchung zeigte nach 4 Tagen DSS-Gabe (4% DSS) eine Veränderung des Oberflächenreliefs, einen Anstieg der Myeloperoxidase und einen Abfall der Mastzell-Tryptase sowie eine Degranulation fast aller Mastzellen. Als nach dem 4. Tag DSS mit Wasser ersetzt worden war, kam es in der Studie ab dem 5. Tag zu einem Anstieg der Mastzellzahl und einem Anstieg von Mastzell-Tryptase, die bis zum Tag 20 nachweisbar war (43).

Diese Ergebnisse könnten einen Hinweis auf die Mitwirkung von Mastzellen und Mastzell-Tryptase im spontanen Heilungsprozess nach Entzündungen des Kolons geben. Da PAR2 durch Mastzell-Tryptase aktiviert werden kann (20) und Mastzellen in der Lage sind PAR2 zu exprimieren (25), ist eine Beteiligung von PAR2 und damit eine antiinflammatorische Wirkung im spontanen Heilungsprozess bei entzündlichen Erkrankungen genauso denkbar, wie eine proinflammatorische Wirkung bei der Generation einer initialen zellulären Immunantwort auf inflammatorische Reize.

Insgesamt ist das Verhalten von PAR2 in Tiermodellen, wie dem DSS-Colitis-Modell nur unzureichend erforscht.

Unsere Studien, das DSS-Kolitis-Modell betreffend, zeigen eine ausgeprägte Up – Regulation von PAR2 in den Epithelzellen des Dickdarmes. Diese ist nicht nur in den Versuchstieren mit akuter sondern auch in den Tieren der Versuchsgruppe mit chronischer Kolitis nachweisbar. Im Experiment konnte bei den Tieren mit akuter Kolitis eine 3,6fache und bei der chronischen Kolitis eine 4,2fache Steigerung der PAR2 Genexpression gezeigt werden. Wie die Expressionsrate von mmCxcl2 erkennen lässt, handelt es sich bei beiden Gruppen um nachgewiesene Entzündungen des Dickdarmes. Es ist außerdem noch zu erwähnen, dass das Ausmaß der Entzündung bei der akuten DSS – Kolitis mit 217facher Steigerung der Genexpression von mmCxcl2 ausgeprägter ist als bei der chronischen DSS – Kolitis. Bei dieser ist die mmCxcl2 Expression auf das 78fache angehoben.

Es zeigte sich in unseren Ergebnissen, in den zuvor beschriebenen Studien, wie auch in den nachfolgenden Versuchen, dass es bei entzündlichen Vorgängen im Gastrointestinaltrakt zu einer deutlichen Steigerung der Genexpression von PAR2 kommt.

Dies erhärtet die Theorie, dass PAR2 eine wichtige Rolle im Verlauf von Entzündungen einnimmt, möglicherweise sogar mit am Anfang der Entzündungsreaktion steht. Außerdem lässt der Unterschied im Ausmaß der Expressionsveränderung von PAR2 einen die Entzündung modulierenden Einfluss von PAR2 bei akuten bzw. chronischen Erkrankungen vermuten.

Um zu untersuchen, ob sich die PAR2 Genexpression bei humanen chronischen Entzündungen ähnlich verhält, wie in den in vivo Experimenten an der Maus, wurden in Patientenproben von Patienten mit histologisch gesicherter Diagnose M. Crohn und Colitis ulcerosa die Genexpression von PAR2 und PAR2 regulierender Gene bestimmt.

4.4. Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa

Alle zuvor genannten Studien konnten zwar eine Mitwirkung von PAR2 und seinen regulierenden Genen PSTI und T8 bei der Auslösung und Modulation von Entzündungsprozessen *in vitro* bei intestinalen Epithelzellen bzw. *in vivo* bei Entzündungsmodellen im Tierversuch nachweisen, jedoch gibt es nur wenige Studien, die sich mit dem Einfluss von PAR2 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen, wie z.B. M. Crohn oder Colitis ulcerosa, befassen.

Die Ursache der o.g. Erkrankungen ist bis heute nur unzureichend geklärt. Bis heute werden neben einer genetischen Prädisposition auch Ernährungs- und Umweltfaktoren, intestinale Keime bzw. psychischer Stress als mögliche Ursache diskutiert (53).

Studien der letzten Jahre zeigen, dass den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vielmehr als früher angenommen eine Störung der angeborenen unspezifischen Immunität zugrunde liegt. Die Charakterisierung der Funktion von NOD2/Card15, dem im Jahr 2001 als erstes beschriebenen mit M. Crohn assoziierten Gen, unterstreicht diese Sichtweise. Das Genprodukt von NOD2 fungiert als intrazellulärer Sensor für ein bakterielles Peptidoglycan und wird durch das sowohl in gram positiven als auch gram negativen Bakterien vorhandene Muramyl-dipeptid (MDP) aktiviert (14). Die Stuttgarter Arbeitsgruppe um Stange und Wehlamp sieht die gestörte Bildung von Defensinen, körpereigenen antimikrobiell wirkenden Peptiden, als wesentlichen auslösenden Faktor in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, vor allem aber des M. Crohn (29) an. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von β -Defensinen bei Biopsieproben von Patienten mit Colitis ulcerosa und M. Crohn im Vergleich zu gesunden Kontrollproben verändert waren. Das β -Defensin hBD-1 war bei beiden Patientengruppen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe marginal supprimiert, wohingegen die Expression von hBD-2 bei Patienten mit Colitis ulcerosa deutlich gesteigert war. In den Patientenproben des M. Crohn Kollektives konnte dagegen keine Veränderung der Expression des β -Defensins hBD-2 gemessen werden (97). Wehkamp et al. konnten außerdem zeigen, dass bei Patienten mit M. Crohn, vor allem beim Befall des terminalen Ileums, die Spiegel der α -Defensine HD-5 und HD-6 supprimiert sind (99).

Anderen Daten zeigten wiederum, dass auch Mastzellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Colitis ulcerosa einnehmen (74). Es fiel auf, dass in Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa die Anzahl an Mastzellen und deren Mediatoren, wie Histamin, Serin-Proteasen, Leukotrienen und Prostaglaninen deutlich gesteigert waren.

Des Weiteren zeigten Mäuse mit einem Defizit an Mastzellen, beim Versuch durch DSS eine chemische Kolitis zu induzieren, ein Ausbleiben der Kolitis (3).

Eine Studie, die die Aktivierung von PAR durch die Mastzell-Tryptase untersuchte, verglich 9 Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa mit 9 Gewebeproben von gesunden Patienten auf das Vorhandensein von PAR2 und TNF- α mittels Immunhistochemie (50). Zudem wurde in dieser Arbeit die Sekretion von TNF- α durch die humane Mastzell-Zelllinie HMC-1 (human leukemic mast cell line – 1) nach der Aktivierung von PAR2 durch Trypsin, Tryptase und dem PAR2-aktivierenden Peptid SLIGRL näher beleuchtet. Es zeigte sich, dass bei den Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa deutlich mehr Zellen vorlagen, die PAR2 oder TNF- α exprimierten. Es konnte ebenfalls belegt werden, dass ca. 65% der in den Gewebeproben nachgewiesenen PAR2 positiven Zellen auch Tryptase - positive Zellen waren. 60% der TNF- α exprimierenden Zellen waren Tryptase – positive Mastzellen. Die Arbeitsgruppe stellte die These auf, dass Mastzellen eine wichtige Rolle bei der Auslösung und der Unterhaltung von Entzündungen über die Aktivierung von PAR2 durch die Mastzell-Tryptase einnehmen.

Diese Ergebnisse stellen einen weiteren Hinweis dar, dass durch die Aktivierung von PAR2 entzündliche Prozesse ausgelöst werden können und es scheint, dass PAR2 durch seine beinahe ubiquitäre Expression für den Ablauf eines Entzündungsprozesses eine bedeutende Rolle spielt, möglicherweise für die Auslösung grundlegender Reaktionsmechanismen, wie die Aktivierung von Mastzellen (25), neutrophilen (41) und eosinophilen (61) Granulozyten verantwortlich ist.

Wie zuvor erwähnt, wird über die Aktivierung von PAR2 durch *Porphyromonas gingivalis* eine Steigerung der Expression des Defensins hBD-2 in humanen Epithelzellen der Gingiva hervorgerufen (16). Diese Steigerung der Genexpression von Defensinen durch die Aktivierung von PAR2 belegte erneut, dass PAR2 auch in antimikrobielle Prozesse eingebunden ist und neben der bisher gezeigten proinflammatorischen Rolle damit auch eine mögliche antiinflammatorische Wirkung besitzt.

Zusammenfassend legen alle Studien nahe, dass bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zum einen eine Störung der mucosalen Immunabwehr, mit einer überschießenden T-Zell Reaktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine und zum anderen eine veränderte Mikroflora verbunden mit einer Störung der

Dünndarmpermeabilität vorliegt (53, 87). Ein Teil der Entzündungskaskade läuft PAR2 vermittelt ab.

Höchstwahrscheinlich sind dies jedoch nicht die einzigen und allein auslösenden Veränderungen, die zu einem chronisch entzündlichen Prozess führen.

In unserer Studie haben wir die Expression von PAR2 und IL-8 in humanen Gewebeproben von Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Um ein genaueres Verständnis von PAR2 und der Rolle der PAR2 Genexpression zu erhalten, haben wir nachfolgend nochmals innerhalb der M. Crohn und Colitis ulcerosa Patientenkollektive Gewebeproben im akuten Entzündungsschub mit Gewebeproben von Patienten, welche klinisch und histologisch entzündungsfrei waren, miteinander verglichen.

Unsere Ergebnisse konnten für die Gewebeproben von Patienten mit histologisch gesicherter Diagnose M. Crohn, die sich momentan nicht in einem akuten Entzündungsschub befinden, eine verminderte Reaktion von PAR2 im term. Ileum (0,8fach) und eine Steigerung der PAR2 Genexpression im Coecum, (1,9fach) im Sigma (2,3fach) und im Rectum (3,1fach) zeigen. Dagegen wiesen die Gewebeproben von Patienten mit histologisch gesicherter Diagnose M. Crohn, welche sich momentan in einem akuten Entzündungsschub befinden, bis auf eine geringe 1,3fache Steigerung der PAR2 Genexpression im term. Ileum in den anderen Darmabschnitten kaum eine Veränderung der PAR2 Genexpression auf. In beiden Patientenkollektiven war jedoch eine deutliche Steigerung der IL-8 Expression nachweisbar.

Auffällig war, dass bei den Gewebeproben im akuten Entzündungsschub sichtbar höhere Expressionsraten von IL-8 im term. Ileum mit 12facher, im Coecum mit 8facher und im Sigma mit 17facher Steigerung beobachtet werden konnten. Bei den nicht entzündlich veränderten Gewebeproben wurden im term. Ileum (7fach), im Coecum (3fach) und im Sigma (14fach) niedrigere Werte für die IL-8 Genexpression gemessen.

Eine weitere Besonderheit stellte die Expression von IL-8 im Rectum der Gewebeproben beider Patientenkollektive dar. Die Expressionsraten waren bei beiden Patientenkollektiven deutlich erhöht und zeigten im Rectum der nicht entzündlich veränderten Gewebeproben mit 35fachem Anstieg die stärkste Veränderung. Im Rectum der entzündlich veränderten Gewebeproben wurde die zweithöchste Ausprägung mit 14fachem Anstieg der IL-8 Genexpression erreicht.

Bei den Gewebeproben von Patienten mit histologisch gesicherter Diagnose Colitis ulcerosa, die momentan nicht akut entzündet waren, war die Genexpression von PAR2 deutlich reduziert. Im Sigma konnte eine Reduktion der Genexpression auf das 0,8fache

und im Rectum auf 0,6fache gemessen werden. Dagegen wurde in den akut entzündlich veränderten Gewebeproben nur eine geringe Steigerung der PAR2 Genexpression im Sigma (1,3fach) und im Rectum keine Veränderung der Genexpression von PAR2 beobachtet.

Demgegenüber zeigten die Expressionsraten von IL-8 in beiden Patientenkollektiven eine Steigerung der Genexpression, welche in den Gewebeproben, die sich im akuten Schub befanden, im Sigma 14fach und im Rectum 44fach gesteigert waren. Im Vergleich dazu ergaben die nicht im Entzündungsschub gewonnenen Patientenproben nur einen 3,6fachen Anstieg im Sigma und einen 2,1fachen Anstieg im Rectum.

Festzustellen ist, dass die Genexpression von IL-8 in allen Patientenkollektiven in unseren Messungen wirksam gesteigert war, unabhängig davon, ob es sich um Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa handelte, wobei bei Gewebeproben im akuten Entzündungsschub deutlich höhere Anstiege der IL-8 Genexpression gemessen werden konnten, als bei Gewebeproben, die nicht entzündlich verändert waren.

Bei der Expressionsrate von PAR2 fällt auf, dass nur in den nicht entzündlich veränderten Proben von Patienten mit M. Crohn eine stärkere Erhöhung der Genexpression von PAR2 nachweisbar war. Für alle anderen Proben ließ sich kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten von PAR2 finden.

Mit den Erkenntnissen der zuvor erwähnten Studien und den bereits genannten eigenen Ergebnissen konnten wir belegen, dass es auch in vivo beim Menschen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie M. Crohn oder Colitis ulcerosa, zu einem Anstieg der Expression von IL-8 kommt.

Hervorzuheben ist, dass wir nachweisen konnten, dass in Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa, welche klinisch und histologisch als nicht entzündlich veränderte Proben eingeordnet worden sind, trotzdem eine deutlich erhöhte Genexpression von IL-8 vorlag. Dies legt den Verdacht nahe, dass trotz klinischem und histologischem Fehlen von Entzündungszeichen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden ein veränderter Ablauf der Immunreaktion von intestinalen Epithelzellen bzw. eine dauerhaft erhöhte Abwehrbereitschaft mit möglicherweise dauerhaft gesteigerter Produktion und Sekretion von IL-8 vorliegt. Auch lässt dies vermuten, dass neben dem von uns bestimmten IL-8 die Expressions- und Sekretionsraten weiterer proinflammatorisch wirkender Zytokine und Chemokine in Ruhe bzw. außerhalb eines Entzündungsschubes deutlich erhöht sind.

Eventuell ist gerade das erhöhte Auftreten von proinflammatorischen Zytokinen als Zeichen einer veränderten Immunität zu werten.

Die Ursachen der beiden von uns untersuchten chronischen Darmerkrankungen sind, wie schon zuvor erwähnt, bis heute nicht genau bekannt.

Es gibt jedoch drei ganz klare pathogenetische Konzepte, die eine genetische Prädisposition, Störungen der mukosalen Barrierefunktion sowie in der intestinalen Flora die Ursache der chronischen Darmerkrankungen sehen (53).

Die Veränderung des Expressionsverhaltens mit einer erhöhten Ruheexpression von proinflammatorischen Zytokinen kann wahrscheinlich als Ausdruck einer fehlenden Normalisierung gewertet werden.

Möglicherweise sind in den nicht entzündlich veränderten Gewebeproben neben IL-8 und anderen proinflammatorisch wirkenden Zytokinen auch Zytokine mit antiinflammatorischer Wirkung exprimiert, wobei bei diesen Patienten das Verhältnis zugunsten der antiinflammatorisch wirkenden Zytokine verschoben sein könnte.

Um diese Hypothesen zu klären, müssen aber weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um zu klären, ob und ggf. wann eine immunologische Restitutio ad integrum auftritt. Dies könnte an das Vorhandensein weiterer pro- bzw. antiinflammatorisch wirkender Zytokine, Chemokine oder anderer Moleküle geknüpft sein.

Die gesteigerte Expression von PAR2 die wir nur in den nicht entzündlich veränderten Gewebeproben der Patienten mit M. Crohn nachweisen konnten, könnte ein weiterer Hinweis für eine antiinflammatorische Komponente der Wirkung von PAR2 sein.

Dass PAR2 eine wichtige Rolle in antiinflammatorischen Prozessen einnehmen kann, wurde in zwei in vivo Tiermodellen belegt. Im ersten Tiermodell, in dem bei Mäusen mittels TNBS (2, 4, 6 – trinitrobenzene sulfonic acid) eine experimentelle Kolitis induziert wurde, führte die Aktivierung von PAR2 durch das PAR2-aktivierende Peptid SLIGRL zu einer dosisabhängigen Reduktion der makroskopischen und mikroskopischen Entzündungszeichen der Colitis (32).

Im zweiten Tiermodell wurde bei Ratten die Schleimsekretion des Magens nach Gabe von Indomethacin (9mg/kg KG) in Verbindung mit der Aktivierung von PAR2 durch das intravenös verabreichte PAR2-aktivierende Peptid SLIGRL untersucht (49). Außerdem wurde der Einfluss der PAR2 Aktivierung auf die Folgen von Magenschleimhautschädigungen durch ein Ethanol/HCl Gemisch (60% Ethanol / 150mM HCl) und Indomethacin (25mg/kg KG) näher beleuchtet. Zusätzlich analysierte die Arbeitsgruppe in einer zweiten Versuchsreihe die Rolle von afferenten Neuronen auf die Schleimsekretion nach Capsaicinblockade (insgesamt 125mg/kg KG) (49).

Es zeigte sich, dass durch die Gabe von Indomethacin und gleichzeitiger Aktivierung von PAR2 die Schleimsekretion im Magen der Ratte nicht unterbunden werden konnte.

Im zweiten Experiment wurde durch die Aktivierung von PAR2 durch das PAR2-aktivierende Peptid SLIGRL eine dosisabhängige (0,02, 0,2 und 0,5 µmol/kg KG SLIGRL) Reduktion der Magenschleimhautschädigungen, unabhängig der eingesetzten Noxe, hervorgerufen. Die protektiven Effekte der PAR2 Aktivierung waren nach Blockade afferenter Neurone mittels Capsaicin nicht mehr nachweisbar.

Bis auf die erhöhte PAR2 Expression in den nicht entzündlich veränderten Gewebeproben von M. Crohn Patienten waren in unseren Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von PAR2 im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe erkennbar.

Da es keine Daten für die PAR2 Expression in vivo bei humanen chronischen Darmerkrankungen gibt, stehen uns keine Studienergebnisse als Vergleich oder Bezug zur Verfügung.

Sicher ist, dass es vor der Entnahme der Gewebeproben eine interzelluläre Beziehung zwischen den von uns untersuchten intestinalen Epithelzellen und Zellen des Immunsystems sowie zwischen den intestinalen Epithelzellen und Bestandteilen der intraluminalen Flüssigkeit, wie Nahrungsbestandteilen und Flora des Darmes gegeben hat.

Deshalb ist die scheinbar unveränderte Genexpression von PAR2 eine mögliche Folge der Interaktion der intestinalen Epithelzellen mit den vielen Zellen, die in einer biopsierten Darmschleimhaut gefunden werden können.

Möglicherweise ist aber auch das Fehlen einer Veränderung der PAR2 Expression nur ein Zeichen dafür, dass die Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, wie M. Crohn oder Colitis ulcerosa, nicht durch die Mehr- oder Minderexpression eines einzelnen Rezeptors zu erklären ist. Das Vorhandensein von verstärkt exprimierten proinflammatorisch wirksamen Zytokinen, wie IL-8, zeigt vielmehr, dass die Auslösung und das Unterhalten sowie die Modulation einer Entzündung, wie z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen einen äußerst komplexen Prozess darstellt, der höchstwahrscheinlich multifaktorieller Genese ist.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass durch die Aktivierung von PAR2 sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Prozesse in Gang gesetzt sowie reguliert werden können. Die Tatsache, dass PAR2 durch Proteasen von Bakterien, Mastzellen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und der membranständigen Serine-Protease-1 (MTSP-1) aktiviert werden kann, lässt vermuten, dass PAR2 in unterschiedliche Reaktionskaskaden eingebunden ist.

Eventuell spielt die Art der Aktivierung von PAR2, die Stärke der Aktivierung, die Interaktion der verschiedensten PAR2 exprimierenden sowie regulierenden Zellen, die Stärke der Expression von PAR2 sowie der PAR2 regulierenden Gene eine bedeutende Rolle, ob eine Aktivierung des Rezeptors einen proinflammatorischen oder einen antiinflammatorischen Effekt nach sich zieht.

Des Weiteren stellen proinflammatorische sowie antiinflammatorische Reaktionen einer Zelle, sei es im Darm, in den Atemwegen oder einem anderen Organsystem einen ganz normalen Prozess des humanen Immunsystems dar, welche nicht zwangsläufig zu einer Erkrankung führen müssen. Ohne diese Reaktionen wäre unser Immunsystem schutzlos aus der Umwelt oder auch vom Organismus selbst kommenden Noxen ausgeliefert und höchstwahrscheinlich nicht lebensfähig.

Um genaue Aussagen über solch komplexe Vorgänge machen zu können, ist es erforderlich, alle an diesem Vorgang beteiligten Komponenten zu identifizieren und deren Zusammenspiel näher zu ergründen.

Deshalb werden wir in weiteren Versuchsreihen die Funktion und die Expression von PAR2 durch die Untersuchung von weiteren PAR2 regulierenden Genen, wie den membranständigen Serinproteasen, näher beobachten.

5. Literaturverzeichnis

- (1) Abraham, L.A., Chinni, C., Jenkins, A.L., Loubakos, A., Ally, N., Pike, R.N., Mackie, E.J. (2000) – “Expression of protease-activated receptor-2 by osteoblasts” – *Bone* 26, 7-14
- (2) Al-Ani, B., Saifeddine, M., Hollenberg, M.D. (1999) – “Proteinase-activated receptor 2: role of extracellular loop 2 for ligand-mediated activation” – *Br. J. Pharmacol.* 128, 1105-1113
- (3) Araki, Y., Andoh, A., Fujiyama, Y., Bamba, T. (2000) – “Development of dextran sulphate sodium-induced experimental colitis is suppressed in genetically mast cell-deficient *Ws/Ws* rats” – *Clin. Exp. Immunol.* 119, 264-269
- (4) Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B., (1994) – “Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines” – *Adv. Immunol.* 55, 97-179
- (5) Barnes, P.J., (2006) “How corticosteroids control inflammation” – *British J. Pharmacol* 148, 245-254
- (6) Belhem, C.M., Tate, R.J., Scott, P.H., Pemberton, A.D., Miller, H.R., Wadsworth, R.M., Gould, G.W., Pelvin, R. (1996) – “Trypsin stimulates proteinase-activated receptor 2 dependent and –independent activation of mitogen-activated protein kinases” – *Biochem. J.* 320, 939-946
- (7) Böhm, S.K., Grady, E.F., Bunnett, N.W. (1997) – “Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors” – *J. Biol. Chem.* 322, 1-18
- (8) Böhm, S.K., Khitin, L.M., Grady, E.F., Aponte, G., Payan, D.G., Bunnett, N.W. (1996) – “Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor 2” – *J. Biol. Chem.* 271, 22003-22016
- (9) Böhm, S.K., Kong, W., Bromme, D., Smeekeens, S.P., Anderson, D.C., Connolly, A., Kahn, M., Nelken, N.A., Coughlin S.R., Payan, D.G., Bunnett N.W. (1996) – “Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor 2” – *Biochem. J.* 314, 1009-1016

- (10) Borruel, N., Casellas, F., Antolin, M., Llopis, M., Carol, M., Espín, E., Naval, J., Guarner, F., Malagelada, J.R. (2003) – “Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa” – *Am. J. Gastroenterology* 98, 865-870
- (11) Camerer, E., Huang, W., Coughlin, S.R. (1997) – “Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5255-5260
- (12) Cenac, N., Coelho, A.M., Nguyen, C., Compton, S., Andrade-Gordon, P., MacNaughton, W.K., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., Bunnett, N.W., Garcia-Villar, R., Bueno, L., Vergnolle, N. (2002) – “Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor 2” – *Am. J. Pathol.* 161, 1903-1915
- (13) Cenac, N., Garcia-Villar, R., Ferrier, L., Larauche, M., Vergnolle, N., Bunnett, N.W., Coelho, A.M., Fioramonti, J., Bueno, L. (2003) – “Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: Possible involvement of afferent neurons, nitric oxide and paracellular Permeability” – *J. Immunol.* 170, 4296-4300
- (14) Cho J.H. (2008) “Inflammatory bowel disease: Genetic and epidemiologic Considerations” – *World J Gastroenterol*, 14, 338-347
- (15) Chow, J.M., Moffatt, J.D., Cocks, T.M. (2000) – “Effect of protease-activated receptor (PAR)-1, -2 and -4-activating peptides, thrombin and trypsin in rat isolated airways” – *Br. J. Pharmacol.* 131, 1584-1591
- (16) Chung, W.O., Hansen, S.R., Rao, D., Dale, B.A. (2004) – “Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression” – *J. Immunol.* 173, 5165-5170
- (17) Cicala, C., Morello, S., Santagada, V., Caliendo, G., Sorrentino, L., Cirino, G. (2001) – “Pharmacological dissection of vascular effects caused by activation of protease-activated receptors 1 and 2 in anesthetized rats” – *FASEB J.* 15, 1433-1435
- (18) Cocks, T.M., Moffatt, J.D. (2001) – “Protease-activated receptor 2 (PAR2) in the airways” – *Pulm. Pharmacol. Ther.* 14, 183-191
- (19) Connolly, A.J., Ishihara, H., Kahn, M.L., Farese, R.V. Jr., Coughlin S.R. (1996) – “Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor” – *Nature* 381, 516-519

- (20) Corvera, C.U., Dery, O., McConalogue, K., Böhm, S.K., Khitin, L.M., Caughey, G.H., Hollenberg, M.D., Bunnett, N.W. (1997) – “Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2” – J. Clin. Invest. 100, 1383-1393
- (21) Corvera, C.U., Dery, O., McConalogue, K., Gamp, P., Thoma, M., Al-Ani, B., Caughey, G.H., Hollenberg, M.D., Bunnett, N.W. (1999) – “Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2” – J. Physiol. 517, 741-756
- (22) Coughlin S.R., Cramer, E. (2003) – “PARticipation in inflammation” – J. Clin. Invest. 111, 25-27
- (23) Coughlin, S.R., (1994) – “Protease-activated receptors start a family” – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 9200-9202
- (24) D'Andrea, M.R., Derian, C.K., Leturcq, D., Baker, S.M., Brunmark, A., Ling, P., Darrow, A.L., Santulli, R.J., Brass, L.F., Andrade-Gordon, P. (1998) – “Characterization of protease-activated receptor 2 immunoreactivity in normal human tissues” – J. Histochem. Cytochem. 46, 157-164
- (25) D'Andrea, M.R., Rogahn, C.J., Andrade-Gordon, P. (2000) – “Localization of protease-activated receptors – 1 and -2 in human mast cells; indications for an amplified mast cell degranulation cascade” – Biotech. Histochem. 75, 85-90
- (26) Daig, R., Rogler, G., Aschenbrenner, E., Vogl, D., Falk, W., Gross, V., Schölmerich, J., Andus, T., (2000) – “Human intestinal epithelial cells secrete interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 but not interleukin-1 or interleukin-6” – Gut 46, 350-358
- (27) DeFea, K.A., Zalefsky, J., Thoma, M.S., Dery, O., Mullins, R.D., Bunnett, N.W. (2000) – “Beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2” – J. Cell. Biol. 148, 1267-1281
- (28) Dery, O., Thoma, M.S., Wong, H., Grady, E.F., Bunnett, N.W. (1999) – “Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor” – J. Biol. Chem. 274, 18524-18535
- (29) Eckmann, L., (2005) – “Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections” – Curr. Opin. Gastroenterol 21, 147-151

- (30) Eckmann, L., Jung, H.C., Schürer-Maly, C., Panja A., Morzycka-Wroblewska E., Kagnoff M.F. (1993) – “Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8” – *Gastroenterology* 105, 1689-1697
- (31) Ferrell, W.R., Lockhart, J.C., Kelso, E.B., Dunning, L., Plevin, R., Meek, S.E., Smith, A.J.H., Hunter, G.D., Mclean, J.S., McGarry, F., Ramage, R., Jiang, L., Kanke, T., Kawagoe, J. (2003) – “Essential role for proteinase - activated receptor 2 in arthritis” – *J. Clin. Invest.* 111, 35-41
- (32) Fiorucci, S., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Distrutti, E., Vergnolle, N., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Morelli, A., Cirino, G. (2001) – “Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13936-13941
- (33) Gross, V., Andus, T., Daig, R., Aschenbrenner, E., Scholmerich, J., Falk, W. (1995) – “Regulation of interleukin-8 production in a human colon epithelial cell line (HT-29)” – *Gastroenterology* 108, 653-661
- (34) Hamilton, J.R., Moffatt, J.D., Tatoulis, J., Cocks, T.M. (2002) – “Enzymatic activation of endothelial protease-activated receptors is dependent on artery diameter in human and porcine isolated coronary arteries” – *Br. J. Pharmacol.* 136, 492-501
- (35) Hansen, K.K., Sherman, P.M., Cellars, L., Andrade-Gordon, P., Pan, Z., Baruch, A., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., Vergnolle, N. (2005) – “A major role for proteolytic activity and proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of infectious colitis” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8363-8368
- (36) Hirota, M., Ohmuraya M., Baba, H. (2006) – “The role of trypsin, trypsin inhibitor and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis” – *J. Gastroenterol.* 41, 832-836
- (37) Holzhausen, M., Spolidorio, L.C., Vergnolle, N. (2005) – “Role of protease-activated receptor 2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis” – *Am. J. Pathol.* 168, 1189-1199
- (38) Holzhausen, M., Spolidoro, L.C., Vergnolle, N. (2005) – “Proteinase-activated receptor-2 (PAR2) agonist causes periodontitis in rats” – *J. Dent. Res.* 84, 154-159

- (39) Holzhausen, M., Spolidorio, L.C., Ellen, R.P., Jobin, M.C., Steinhoff, M., Andrade-Gordon, P., Vergnolle, N. (2006) – “Protease-Activated Receptor-2 Activation A Major Role in the Pathogenesis of Porphyromonas gingivalis Infection” – American Journal of Pathology 168, 1189-1199
- (40) Hooper, L.V., Xu, J., Falk, P.G. (1999) – “A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem” – Proc. Natl. Acad. Sci. USA
- (41) Howells, G.L., Macey, M.G., Chinni, C. (1997) – “Proteinase-activated receptor – 2: expression by human neutrophils” – J. Cell. Sci. 110, 881-887
- (42) Hurley, J.C. (1995) – “Antibiotic-induced release of endotoxin. A therapeutic paradox” – Drug. Saf. 3, 183-195
- (43) Iba, Y., Sugimoto, Y., Kamei, C., Masukawa, T. (2003) – “Possible role of mucosal mast cells in the recovery process of colitis induced by dextran sulfate sodium in rats” – Int. Immunopharmacol.3, 485-491
- (44) Ishihara, H., Connolly, A.J., Kahn, M.L., Zeng, Y.W., Timmons, C., Tram, T., Coughlin, S.R. (1997) – “Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans” – Nature 386, 502-506
- (45) Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S.K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., Kagnoff, M.F. (1995) – “A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion” – J. Clin. Invest. 95, 55-65
- (46) Kahn, M.L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M.J., Ishihara, H., Coughlin, S.R. (1999) – “Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin” – J. Clin. Invest. 103, 879-887
- (47) Kahn, M.L., Zheng, Y.W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R.V. Jr., Tam, C., Coughlin S.R. (1998) – “A dual thrombin receptor system for platelet activation “ – Nature 394, 690-694
- (48) Kamada, N., Inoue, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Matsuoka, K., Sato, T., Chinen, H., Hong, K.S., Yamada, T., Suzuki, Y., Suzuki, T., Watanabe, N., Tsuchimoto, K., Hibi, T. (2005) – “Nonpathogenic Escherichia coli strain Nissle1917 prevents murine acute and chronic colitis” – Inflamm. Bowel. Dis. 11, 455-463

- (49) Kawabata, A., Kinoshita, M., Nishikawa, H., Kuroda, R., Nishida, M., Araki, H., Arizono, N., Oda, Y., Kakehi, K. (2001) – “The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection” – *J. Clin. Invest.* 107, 1443-1450
- (50) Kim, J.A., Choi, S.C., Yun, K.J., Kim, D.K., Han, M.K., Seo, G.S., Yeom, J.J., Kim, T.H., Nah, Y.H., Lee, Y.M. (2003) – “Expresion of protease – activated receptor 2 in ulverative colitis” – *Inflamm. Bowel Diseases* 9, 224-229
- (51) King, C., Brennan, S., Thompson, P.J., Stewart, G.A. (1998) – “Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium” – *J. Immunol.* 161, 3645-3651
- (52) Kong, W., McConalogue, K., Khitin, L.M. Hollenberg, M.D., Payan, D.G., Böhm, S.K., Bunnett, N.W. (1997) – “Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8884-8889
- (53) Kreisel, W. (2006) – “Pathogenesis of chronic inflammatory bowel diseases” – *Schweiz Rundsch Med Prax.* 95, 1965-1973
- (54) Kruis, W., Schuetz, E., Fric, P. (1997) – “Double – blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazin in maintaining remission of ulcerative colitis” – *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11, 853-858
- (55) Kuwata, K., Hirota, M., Shimizu, H., Nakae, M., Nishihara, S., Takimoto, A. (2000) – “Functional analysis of recombinant pancreatic secretory trypsin inhibitor protein with amino-acid substituion” – *J. Gastroenterol.* 37, 928-934
- (56) Lammers, K.M., Helwig, U., Swennen, E., Rizello, F., Venturi, A., Caramelli E., Kamm, M.A., Brigidi, P., Gionchetti, P., Campieri, M. (2002) – “Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells” – *Am. J. Gastroenterol.* 97, 1182-1186
- (57) Law, D. (2000) – “Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*” – *J. Appl. Microbiol.* 88, 729-745
- (58) Lerner, D.J., Chen, M., Tram, T., Coughlin, S.R. (1996) – “Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function” – *J. Biol. Chem.* 271, 13943-13947

- (59) Lindner, J.R., Kahn, M.L., Coughlin, S.R., Sambrano, G.R., Schauble, E., Bernstein, D., Foy, D., Hafezi-Moghadam, A., Ley, K. (2000) – “Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice” – J. Immunol. 165, 6504-6510
- (60) Loubakos, A., Potemba, J., Travis, J. (2001) – “Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on humoral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion” – Infect. Immun. 69, 5121-5130
- (61) Miike, S., McWilliams, A.S., Kita, H. (2001) – “Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor – 2” – J. Immunol. 167, 6615-6622
- (62) Mirza, H., Yatsula, V., Bahou, W.F. J. (1996) – “The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells” – J. Clin. Invest. 97, 1705-1714
- (63) Molino, M., Barnathan E.S., Numerof, R., Clark, J., Dreyer, M., Cumashi, A., Hoxie, J.A., Schechter, N., Woolkalis, M., Brass, L.F. (1997) – “Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2” – J. Biol. Chem. 272, 11168-11175
- (64) Niclou, S., Suidan, H.S., Brown-Luedi, M., Monard, D. (1994) – “Expression of the thrombin receptor mRNA in rat brain” – Cell. Mol. Biol. 40, 421-428
- (65) Nystedt, S., Emilsson, K., Larson, A.K., Strombeck, B., Sundelin, J. (1995) – “Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2.” – Eur. J. Biochem. 232, 84-89
- (66) Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., Sundelin, J. (1994) – “Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor” – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 9208-9212
- (67) Nystedt, S., Larsson, A.K., Aberg H., Sundelin, J. (1995) – “The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression” – J. Biol. Chem. 270, 5950 -5955
- (68) Nystedt, S., Ramakrishnan, V., Sundelin, J. (1996) – “The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor” – J. Biol. Chem. 271, 14910-14915

- (69) O'Brien, P.J., Prevost, N., Molino, M., Hollinger, M.K., Woolkalis, M.J., Woulfe, D.S., Brass, L.F. (2000) – "Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1" – J. Biol. Chem. 275, 13502-13509
- (70) O'Neil, D. A., Porter, E. M., Elewaut, D., Anderson, G. M., Eckmann, L., Ganz, T., Kagnoff, M. F. (1999) – "Expression and regulation of the β -Defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium" – J. Immunol. 163, 6718-6724
- (71) Olejár, T., Matěj, R., Zadinová, P. (2001) – "Expression of proteinase-activated receptor 2 during taurocholate-induced acute pancreatic lesion development in wistar rats" – Int. J. Gastrointest. Cancer. 30, 113-121
- (72) Ossovskaya, V., Bunnett, N.W. (2004) – "Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease" – Pysiol. Rev. 84, 579-621
- (73) Paetzel, M., Dalbey, R.E., Straynadka, N.C.J. (2000) – "The structure and mechanism of bacterial type-1 signal peptidases – a novel antibiotic target" – J. Pharmacol. Therap. 87, 27-49
- (74) Raithel, M., Winterkamp, S., Pacurar, A. (2001) – "Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease" – Scand. J. Gastroenterol 36, 174-179
- (75) Rasmussen, U.B., Vouret-Craviari, V., Jallat, S., Schlesinger, Y., Pages, G., Pavirani, A., Lecocq, J.P., Pouyssegur, J., Van Obberghen-Schilling, E. (1991) – "cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization" – FEBS Lett. 288, 123-128
- (76) Rhen T., Cidlowski J.A. (2005) – "Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs" – N. Engl. J. Med. 353, 1711-1723
- (77) Robin, J., Kharbanda, R., McLean, P., Campbell, R., Vallance, P. (2003) – "Protease-activated receptor 2-mediated vasodilatation in humans in vivo: role of nitric oxide and prostanoids" – Circulation 107, 954-959
- (78) Roostermann, D., Schmidlin, F., Bunnett, N.W. (2003) – "The third intracellular loop and carboxyl tail of neurokinin 1 and 3 receptors determine interactions with beta-arrestins" – Am. J. Physiol. Cell Physiol. 284, 1319-1329

- (79) Schmidlin, F., Amadesi, S., Dabbagh, K., Lewis, D.E., Knott, P., Bunnett, N.W., Gater, P.R., Geppetti, P., Bertrand, C., Stevens, M.E. (2002) – “Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway” – J. Immun. 169, 5315-5321
- (80) Schultz, M., Strauch, U.G., Linde, H.J., Watzl, S., Obermeier, F., Gottl, C., Dunger, N., Grunwald, N., Scholmerich, J., Rath H.C. (2004) – “Preventive effects of Escherichia coli strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis “ – Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11, 372-378
- (81) Shpacivitch, V. M., Brzoska, T., Buddenkotte, J., Stroh, C., Sommerhoff, C.P., Ansel, J.C., Schulze-Osthoff, K., Bunnett, N.W., Luger, T.A., Steinhoff, M. (2002) – “Agonist of Proteinase-Activated Receptor 2 induce Cytokine Release and Activation of nuclear Transcription Factor κ B in human dermal microvascular endothelial Cells“ – J. Invest. Dermatol. 118, 380-385
- (82) Smith, R., Ransjö, M., Tatarczuch, L., Song, S.J., Pagel, C.N., Morrison, J.R., Pike, R.N., Mackie, E.J. (2004) – “Activation of protease-activated receptor-2 leads to inhibition of osteoclast differentiation” – J. Bone miner. Res. 19, 507-516
- (83) Stadnyk, A.W., Kearsey, J.A. (1996) – “Pattern of proinflammatory cytokine mRNA expression during Trichinella spiralis infection of the rat” – Infect. Immun. 64, 5138-5143
- (84) Stadnyk, A.W., Waterhouse C.C.M. (1997) – “Epithelial cytokines in intestinal inflammation and mucosal immunity” – Curr. Opin. Gastroenterol 13, 510-517
- (85) Steinhoff, M., Corvera, C.U., Thoma, M.S., Kong, W., McAlpine, B.E., Caughey, G.H., Ansel, J.C., Bunnett, N.W. (1999) – “Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase” – Exp. Dermatol. 8, 282-294
- (86) Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognette, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., Mitchell, S.E. Williams, L.M., Geppetti, P., Mayer, E.A., Bunnett N.W. (2000) – “Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism” – Nat. Med. 6, 151-158

- (87) Strober, W., Fuss, I., Mannon, P. (2007) – “The fundamental basis of inflammatory bowel disease” – J. Clin. Invest. 117, 514-521
- (88) Sun, G., Stacey, M.A., Schmidt, M., Mori, L., Mattoli, S. (2001) – “Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells” – J. Immunol. 167, 1014-1021
- (89) Swain, M.G.; Ajuebor, M.N., (2002) – “Role of chemokines and chemokine receptors in the gastrointestinal tract” – Immunology 105, 137-143
- (90) Takeuchi, T., Harris, J.L., Huang, W., Yan, W.K., Coughlin, S.R., Craik, C.S. (2000) – “Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates” – J. Biol. Chem. 275, 26333-26342
- (91) Uehara, A., Muramoto, K., Takada, H., Sugawara, S. (2003) – “Neutrophil serine proteases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2” – J. Immun. 170, 5690-5696
- (92) Uehara, A., Sugawara, S., Muramoto, K., Takada, H. (2002) – “Activation of human oral epithelial cells by neutrophil proteinase 3 through protease-activated receptor-2 “ – J. Immunol. 169, 4594-4603
- (93) Vergnolle, N. (1999) – “Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo” – J. Immunol. 163, 5064-5069
- (94) Vergnolle, N., Wallace, J.L., Bunnett, N.W., Hollenberg, M.D. (2001) – “Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain” – Trends pharmacol. Sci. 22, 146-152
- (95) Vergnolle, N., Hollenberg, M.D., Sharkey, K.A., Wallace, J.L. (1999) – ”Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR2)-activating peptides in the rat paw” – Br. J. Pharmacol. 127, 1083-1090
- (96) Vu, T.K., Hung, T.D., Wheaton, V.I., Coughlin, S.R. (1991) – “ Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation” – Cell 64, 1057-1068
- (97) Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Müller, O., Herrlinger, K. R., Fellermann, K., Schröder, J. M., Stange, E. F. (2003) – “Inducible and constitutive β -Defensins are differentially expressed in crohn’s disease and ulcerative colitis” – Inflamm. Bowel Disease 9, 215-223

- (98) Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, E., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schröder, J., M., Stange, E. F. (2004) – “NF- κ B- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a Novel Effect of a Probiotic Bacterium” – *Infect. Immun.* 72, 5750–5758
- (99) Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schröder, J.M., Bevins, C.L., Fellermann, K., Stange, E.F. (2004) – “NOD2 (CARD15) mutations in Crohn’s disease are associated with diminished mucosal α -defensin expression” – *Gut* 53, 1658-1664
- (100) Witt, H., Luck, W., Hennies, H. C., Classen, M., Kage, A., Lass U. (2000) – “Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis” – *Nat. Genet.* 25, 213-216
- (101) Xu, W.F., Andersen, H., Whitmore, T.E., Presnell, S.R., Yee, D.P., Ching, A., Gilbert, T., Davie, E.W., Foster, D.C. (1998) – “Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4” – *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6642-6646
- (102) Yoshida, N., Katada, K., Handa, O., Takagi, T., Kokura, S., Naito, Y., Mukaida, N., Soma, T., Shimada, Y., Yoshikawa, T., Okanoue, T. (2007) – “Interleukin-8 production via protease-activated receptor 2 in human esophageal epithelial cells” – *Int. J. Mol. Med.* 2, 335-340
- (103) Young, E.J., Weingarten, N.M., Baughn, R.E., Duncan, W.C. (1982) – “Studies on the pathogenesis of the Jarisch-Herxheimer reaction: development of an animal model and evidence against a role for classical endotoxin” – *J. Infect. Dis.* 146, 606-615
- (104) Zhou, X., Girón, J.A., Torres, A.G., Crawford, A., Negrete, E., Vogel, S.N., Kaper, J.B. (2003) – “Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells” – *Infect. Immun.* 71, 2120-2129
- (105) Ziambaras, T., Rubin, D.C., Perlmutter, D.H. (1996) – “Regulation of sucrase-isomaltase gene expression in human intestinal epithelial cells by inflammatory cytokines” – *J. Biol. Chem.* 271, 1237-1242

6. Herstellerverzeichnis

- | | | |
|-----|------------------------|--|
| 1) | Amersham Biosciences | Munzinger Str. 9, 79111 Freiburg, Deutschland |
| 2) | Applied Biosystems | Frankfurter Str.129 B, 64293 Darmstadt, Deutschland |
| 3) | B.Braun | Carl-Braun-Straße 1, 34212 Melsungen, Deutschland |
| 4) | BioRad | Heidemannstr. 164, 80939 München, Deutschland |
| 5) | Biophotonics Corp. | Schlossgasse 4, CH-9320 Arbon, Schweiz |
| 6) | Dr. Junghans medical | Käthe-Kollwitz Str. 34, 04651 Bad Lausick, Deutschland |
| 7) | Eppendorf | Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland |
| 8) | Fresenius | Else-Kröner-Straße 1, 61352 Bad Homburg, Deutschland |
| 9) | Gibco Invitrogen Corp. | Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Deutschland |
| 10) | Greiner Bio One | Maybachstrasse 2, 72636 Frickenhausen, Deutschland |
| 11) | Heidolph | Walpersdorfer Str. 12, 91126 Schwabach, Deutschland |
| 12) | Hellma | Klosterrunsstr. 5,79379 Müllheim, Deutschland |
| 13) | Heraeus instruments | Münsterstr. 330, 40470 Düsseldorf, Deutschland |
| 14) | ICN Biomedicals | Thüringer Str. 15, 37269 Eschwege, Deutschland |
| 15) | Integra Biosciences | Ruhberg 4, 35463 Fernwald, Deutschland |
| 16) | Kobe | Rosenstraße 16, 35037 Marburg, Deutschland |
| 17) | Landgraf Laborgeräte | Magdeburger Str. 3, 30855 Langenhagen, Deutschland |
| 18) | Liebherr | Memminger Str. 77, 88416 Ochsenhausen, Deutschland |
| 19) | MBI Fermentas | Opelstr. 9, 68789 St. Leon-Rot, Deutschland |
| 20) | Merck | Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Deutschland |

- | | | |
|-----|------------------|--|
| 21) | Mettler | Ockerweg 3, 35353 Giessen, Deutschland |
| 22) | MWG Biotech | Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Deutschland |
| 23) | PAA Lab. GmbH | Unterm Bornrain 2, 35091 Cölbe, Deutschland |
| 24) | PAN Biotech GmbH | Gewerbepark 13, D-94501 Aidenbach, Deutschland |
| 25) | Quiagen | QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Deutschland |
| 26) | Riedel-de Haen | Wunstorfer Strasse 40, 30926 Seelze, Deutschland |
| 27) | Roche | Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim,
Deutschland |
| 28) | Sarstedt | Rommelsdorfer Straße, 51582 Nümbrecht,
Deutschland |
| 29) | Sigma Aldrich | Riedstrasse 2, 89555 Steinheim, Deutschland |
| 30) | Systec | Sandusweg 11, 35435 Wettenberg, Deutschland |
| 31) | Tesa | Quickbornstr. 24, 20253 Hamburg, Deutschland |
| 32) | Whirlpool | Gottlob-Bauknecht Str. 1, 73602 Schorndorf,
Deutschland |

7. Zusammenfassung

Seit je her spielen entzündliche Vorgänge und deren beeinflussende Faktoren sowie Diagnostik und Therapie in der Medizin eine essentielle Rolle. Das genaue Verständnis über die Genese, Einflussfaktoren und den Verlauf einer Entzündungsreaktion ist für die Behandlung von Krankheiten und für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte von großer Bedeutung. Die Aktivierung von PAR2 in verschiedenen Organen führt zu Reaktionen, die als proinflammatorisch einzustufen sind und legen für PAR2 eine entscheidende Rolle in der Induktion und im Verlauf eines Entzündungsprozesses nahe. Bis heute ist jedoch die Funktion von PAR2 in Physiologie und Pathophysiologie des Gastrointestinaltraktes immer noch unzureichend verstanden. Aus diesem Grund haben wir die Expression von PAR2 in einem für Entzündungsvorgänge mehrfach erprobten Zellkulturmodell mit den intestinalen Kolonkarzinom-Epithelzelllinien HT29 und Caco2 in verschiedenen Entzündungsmodellen (Zytokine, gram positiven und negativen, invasive, non invasive, probische Bakterien) untersucht. Mit den Ergebnissen dieser akuten in vitro Entzündungsreaktionen richteten wir unser Interesse auf intestinale in vivo Entzündungsreaktionen. Hierzu wählten wir ein ebenfalls erprobtes Entzündungstiermodell, das DSS-Colitis-Modell der Maus. Um weitere Erkenntnisse über das Expressionsverhalten von PAR2 bei Entzündungsreaktionen in vivo zu gewinnen, folgte nun die Untersuchung von humanen Dünndarm- und Dickdarmproben bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa, bei denen wir die Expression von PAR2 mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Da bei beiden Erkrankungen Theorien über eine abnorme Immunreaktion diskutiert werden, könnten die Ergebnisse unserer Studien, einen weiteren Erklärungsansatz für Ursache der Autoimmunerkrankung bieten und möglicherweise zukünftig über die selektive Blockierung des Rezeptors auch für die Therapie von entzündlichen Erkrankungen von Bedeutung sein. Wir konnten in unserem Entzündungsmodell mit Zytokinen einen IL-8 und PAR2 Anstieg bei HT29 und Caco2 nach Stimulation mit IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und LPS nachweisen. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Besiedlung bzw. die Infektion intestinaler Epithelzellen mit Keimen der physiologischen Darmflora, wie auch invasiven gram negativen und positiven Bakterien, zu einer starken Induktion von PAR2 führt. Dies legt nahe, dass über oder mit Hilfe von PAR2 Mikroben im Darm „wahrgenommen“ und das PAR2 sowohl zur Homöostase im physiologischen Zustand als auch zur Abwehr im pathophysiologischen Zustand beiträgt. Im Folgeexperiment nahm das Ausmaß der PAR2 Induktion bei allen

E.coli Stämmen vom hitzeinaktivierten Bakterium über das vitale Bakterium zum Überstand hin deutlich ab. Es fiel außerdem auf, dass bei allen Bakterien die hitzeinaktivierten Überreste die stärksten Induktoren der IL-8 bzw. der PAR2 Expression darstellten. Außerdem führte das Vorhandensein von Escherichia coli Nissle 1917 zu einer verstärkten Aktivierung und Expression von PAR2 und darüber hinaus zu einer verstärkten Expression und Sekretion von enteroprotektiven, antimikrobiell wirkenden Peptiden, wie dem β -Defensin hBD-2 und erklärt dadurch teilweise seine enteroprotektive Wirkung. Im DSS-Kolitis-Modell fiel ebenfalls eine ausgeprägte Steigerung der PAR2 Expression auf. Diese ist nicht nur in den Versuchstieren mit akuter sondern auch in den Tieren der Versuchsgruppe mit chronischer Kolitis nachweisbar. Es zeigte sich in unseren Ergebnissen, in den zuvor beschriebenen Studien, wie auch in den nachfolgenden Versuchen, dass es bei entzündlichen Vorgängen im Gastrointestinaltrakt zu einer deutlichen Steigerung der Genexpression von PAR2 kommt. Wir konnten belegen, dass es auch in vivo beim Menschen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie M. Crohn oder Colitis ulcerosa, zu einem Anstieg der Expression von IL-8 kommt. Bei PAR2 fiel auf, dass es nur in den nicht entzündlich veränderten Proben von Patienten mit M. Crohn eine stärkere Erhöhung der Genexpression von PAR2 nachweisbar war. Hervorzuheben ist, dass in Gewebeproben von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa, welche klinisch und histologisch als nicht entzündlich veränderte Proben eingeordnet worden sind, trotzdem eine deutlich erhöhte Genexpression von IL-8 vorlag. Eventuell spielt die Art der Aktivierung von PAR2, die Stärke der Aktivierung, die Interaktion der verschiedensten PAR2 exprimierenden sowie regulierenden Zellen, die Stärke der Expression von PAR2 sowie der PAR2 regulierenden Gene eine bedeutende Rolle, ob eine Aktivierung des Rezeptors einen proinflammatorischen oder einen antiinflammatorischen Effekt nach sich zieht. Des Weiteren stellen proinflammatorische sowie antiinflammatorische Reaktionen einer Zelle, sei es im Darm, in den Atemwegen oder einem anderen Organsystem einen ganz normalen Prozess des humanen Immunsystems dar, welche nicht zwangsläufig zu einer Erkrankung führen müssen. Ohne diese Reaktionen wäre unser Immunsystem schutzlos aus der Umwelt oder auch vom Organismus selbst kommenden Noxen ausgeliefert und höchstwahrscheinlich nicht lebensfähig. Dies zeigt, wie wichtig es ist auch in Zukunft weiter die Wirkung von PAR2 näher zu untersuchen.

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Bertalanfy, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Fruhstorfer, Geus, Gotzen, Griss, Gudermann, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kaffarnik, Kern, Klenk, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lammel, Lang, Lorenz, Maier, Maisch, Moll, Mutters, Oertel, Remschmidt, Renz, Richter, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Seitz, Seyberth, Slenczka, Strempel, Suske, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

9. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Stephan Böhm für die Überlassung des Themas und die vielen wertvollen Hinweise.

Außerdem gebührt Frau Annegret Bosshammer ein großer Dank für Ihre unterstützende Hilfe im Labor sowie für ihr Organisationstalent, durch das viele Engpässe umgangen werden konnten.

Mein ganz besonderer Dank gilt der AG Böhm, mit der ich Tage und auch viele Nächte im Labor verbracht habe und mit deren Hilfe und Unterstützung in Phasen von Frustration und „laborchemischen Rückschlägen“ sicherlich die Vollendung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Danke an meine Freunde Lars und Marcus.

Nicht zuletzt gehört mein Dank meiner Frau Anita, meinem Sohn Max, meiner ganzen Familie und meinem Freund Matthias, die mich während des gesamten Medizinstudiums und darüber hinaus in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.